

Teresa da Silva Borralho

**As aplicações da Prata na Nanotecnologia
Farmacêutica**

**Orientadora: Professora Doutora Catarina Pinto Reis
Co-orientadora: Professora Doutora Patrícia Rijo**

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias de Saúde**

**Lisboa
2017**

Teresa da Silva Borralho

**As aplicações da Prata na Nanotecnologia
Farmacêutica**

Dissertação/Tese defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 14 de setembro de 2017, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação nº: 229/2017, de 03 de julho de 2017, com a seguinte composição:

Presidente:

Prof. ^a Dulce Santos

Arguentes:

Prof. ^a Doutora Marisa Nicolai

Vogais:

Prof. ^a Ana Mirco

Orientador:

Prof. ^a Doutora Catarina Reis

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias de Saúde

Lisboa

2017

*The real voyage of discovery consists
not in seeking new landscapes, but in
having new eyes.*

Marcel Proust

Agradecimentos

Quero agradecer a todas as pessoas que, ao longo do curso me ajudaram e apoiaram direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica, deixando desta forma apenas algumas palavras, e um profundo agradecimento.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, Doutora Catarina Pinto Reis, por me ter proporcionado todas as condições necessárias à elaboração da minha Dissertação pela sua enorme dedicação, total disponibilidade e simpatia com que sempre me recebeu.

Quero agradecer a todos os colegas do laboratório que sempre me ajudaram e se mostraram disponíveis para tirar as minhas dúvidas.

Um obrigado a todos os professores do curso que fazem de tudo para manter o espírito inovador e criativo nos alunos. Agradeço diretamente aos Professores Doutora Patrícia Rijo, Doutora Marisa Nicolai, Doutor Amílcar Roberto, todos eles da ULHT, que me ajudaram em algumas fases do projeto.

À Professora Doutora Ana Viana da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, que permitiu a obtenção de imagens AFM das nanopartículas.

E, por último, o meu maior agradecimento, à minha família. Aos meus sogros, que tudo fizeram para que esta última etapa se tornasse mais fácil, à minha mãe e irmã que sempre me deram forças para continuar, ao meu namorado por todo o apoio e à minha filha Maria Inês.

Índice

Índice de Figuras	I
Índice de Tabelas	II
Resumo	III
<i>Abstract</i>	IV
Abreviaturas.....	V
1. Enquadramento histórico.....	1
2. A Prata.....	4
3. Aplicação da Prata a nível terapêutico	6
4. Métodos de preparação de NpsAg	10
4.1. Métodos físicos	10
Evaporação-condensação	10
Ablação a laser	10
Descarga de arco	11
4.2. Métodos químicos	11
Assistidos por radiação gama.....	12
Assistidos por radiação ultravioleta	12
Eletroquímico	13
Assistidos por micro-ondas	14
Redução química	15
4.3 Métodos que recorrem a microrganismos e outros	16
Bactérias.....	16
Fungos	18
Outros:.....	18
Animais.....	18
Plantas	19
5. Procedimento experimental.....	22
6. Considerações toxicológicas	32
7. Conclusões/ Perspetivas futuras	33
8. Referências bibliográficas.....	34

Índice de Figuras

Figura 1. Diagrama de algumas áreas e aplicações das NpsAg.	2
Figura2. Esquema de possíveis mecanismos de toxicidade das NpsAg como bactericidas	7
Figura 3. Imagem ilustrativa da síntese das NpsAg pelo método eletroquímico	13
Figura 4. Esquema demonstrativo da formação das NpsAg.	15
Figura 5. Esquema do mecanismo de ação da síntese de NpsAg pelo enzima nitrato redutase pelas bactérias e fungos.....	17
Figura 6. Imagens obtidas na síntese de NpsAg em laboratório	22
Figura 7. Distribuição de tamanhos das NpsAg por espectroscopia de correlação fotônica, (A) Citrato de sódio e (B) NaBH ₄	24
Figura 8. Distribuição de tamanhos das NpsAg por espectroscopia de correlação fotônica, (C) Ácido ascórbico com PVA e (D) Ácido ascórbico com PVP.....	24
Figura 9. Curva de calibração da Ampicilina a 256nm.	26
Figura 10. Imagem obtida por AFM das NpsAg com citrato de sódio e ampicilina...27	
Figura 11. Imagem obtida por AFM das NpsAg com NaBH ₄ e ampicilina.....27	
Figura 12. Resultados de eficácia <i>in vitro</i> das bactérias e leveduras com os respectivos halos de inibição	29

Índice de Tabelas

Tabela 1. Resumo das características das plantas para a síntese de NpsAg.	21
Tabela 2. Valores de tamanhos médios e distribuição de tamanhos com o índice de polidispersão das NpAg recorrendo a diferentes agentes redutores e agentes estabilizantes.....	25
Tabela 3. Eficiência de associação da ampicilina nas NpsAg.....	26
Tabela 4. Halos de inibição em milímetros.	29
Tabela 5. Absorvância de ampicilina na gama de concentrações 50-1000µg/mL a 256nm.	26

Resumo

A Nanotecnologia, é a tecnologia que descreve, manipula e cria novos materiais com escala nanométrica, ou seja a medida de 10^{-9} m de unidades do sistema internacional. Tem sido vastamente utilizada para o desenvolvimento de tecnologia mais eficiente. Nos últimos anos, as Nanopartículas de Prata (NpsAg) devido às suas características excepcionais foram adotadas em diversas áreas tais como o tratamento da água, tintas, aparelhos eletrônicos com diversas finalidades, como por exemplo, na saúde para diagnóstico, dispositivos médicos, veiculação de fármacos e material de penso. Nesta última área, as NpsAg são consideradas agentes antibacterianos alternativos aos iões de prata uma vez que possuem propriedades diferentes, devido ao rácio superfície/volume, proporcionando maior interação com a membrana celular e fácil penetração na célula, levando à destruição completa de microrganismos. As NpsAg podem ser sintetizadas por diversos métodos apresentando-se normalmente como uma suspensão coloidal de cor amarela com uma banda característica entre 380 e 450nm. Vários fatores como o tempo de reação, a adição de reagentes, a concentração das espécies reagentes, a temperatura e pH do meio podem condicionar esta síntese. Estes fatores podem afetar a forma, o tamanho, a estabilidade, a reologia, a cristalinidade, a estrutura, a nucleação e, subsequentemente, o crescimento das NpsAg. Os métodos de síntese podem ser categorizados em físicos, químicos e biológicos. Cada método pode transmitir diferentes dimensões, morfologia e elementos de superfície, que alteram a reatividade das nanopartículas com vantagens e desvantagens. Dos métodos físicos e químicos relatados para a síntese de NpsAg, a sua maioria causa potenciais riscos ambientais. Existem ainda métodos que recorrem a microrganismos e plantas, sendo por isso considerados processos mais seguros. Em laboratório, sintetizou-se NpsAg com diferentes agentes redutores e estabilizadores, posteriormente associou-se as NpsAg à Ampicilina. Caracterizou-se as NpsAg por espectroscopia de correlação fotónica e AFM, testou-se a eficácia *in vitro* das NpsAg.

Palavras-chave: Nanotecnologia, iões de prata, NpsAg, antibacteriano, métodos de síntese

Abstract

Nanotechnology, is the technology that describes, manipulates and creates new materials with nanometric scale, that is to say the measurement of 10^{-9} m units of the international system. Has been widely used for more efficient technology development. In recent years, Silver Nanoparticles (NpsAg) have been adopted due to their exceptional characteristics in several areas such as water treatment, paints and electronic devices for various purposes like diagnosis, medical devices drugs delivery and wound material. In this last area, the NpsAg are considered to be an alternative antibacterial agent to silver ions since they have different properties due to the surface / volume ratio, providing greater interaction with the cell membrane and easier penetration into the cell, leading to the complete destruction of microorganisms. NpsAg can be synthesized by several methods. Their aspect is like a yellow colloidal suspension with a characteristic band between 380 and 450 nm. Various factors such as the reaction time, the order of the mixture, the concentration of the reacting species, the temperature and pH of the medium can influence the synthesis. Those factors may affect shape, size, stability, rheology, crystallinity, structure, nucleation and, subsequently, NpsAg's growth. Synthesis methods can be categorized into physical, chemical and biological. Each method can produce different particle dimensions, morphology and surface, which strongly influence the reactivity of the nanoparticles. Of the physical and chemical methods reported for NpsAg synthesis, most of them may have some potential environmental risk. As alternative, there are methods that use microorganisms and plants, and therefore these methods are considered safe processes. In the laboratory, NpsAg was synthesized with different reducing agents and stabilizers, then NpsAg was associated with Ampicillin. The NpsAg was characterized by photon correlation spectroscopy and AFM, the *in vitro* efficacy of NpsAg was tested.

Key-words: Nanotechnology, silver ions, NpsAg, antibacterial, synthesis methods

Abreviaturas

NpsAg - Nanopartículas de prata

nm - Nanómetros

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ROS - Espécies reativas de oxigênio

IL-10 - Interleucina 10

p53 - Proteína 53

UV - Ultravioleta

PEG - Polietilenoglicol

CMC - Carboximetilcelulose sódica

PVP - Polivinilpirrolidona

PVA - Álcool polivinílico

SDS - Dodecil sulfato de sódio

AFM - Microscopia de força atômica

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina

1. Enquadramento histórico

A Nanotecnologia veio modificar a forma como os diversos tipos de materiais são utilizados. "Nano" refere-se a qualquer parâmetro quando é expresso como uma medida de 10^{-9} m de unidades do sistema internacional. Os materiais de origem em grande quantidade apresentam um comportamento muito distinto das suas estruturas atômicas ou moleculares. A Nanotecnologia refere-se a partículas com dimensões que variam entre 1 a 100 nanómetros (nm). O termo não sendo novo, tem sido amplamente utilizado para o desenvolvimento de tecnologia mais eficiente, nas últimas décadas. Em contraste com os seus metais, as nanopartículas metálicas e o seu uso pode ser considerado um produto da ciência moderna. A primeira evidência de nanopartículas metálicas é de 2000 anos atrás. Embora se possa especular se o uso de nanopartículas foi puramente accidental, artesãos de outras culturas demonstraram a exploração deliberada do efeito ótico exclusivo de nanopartículas para criar janelas coloridas das igrejas. As NpsAg foram inicialmente aplicadas para pintar o vidro de cor amarela, enquanto que as de ouro foram usadas para produzir um tom vermelho (Arvizo et al. 2012). Nos últimos anos, as NpsAg devido às suas características excecionais foram adotadas em diversas áreas (Figura 1) tais como o tratamento da água (Jain & Pradeep 2005), cosméticos (Gajbhiye & Sakharwade 2016), tintas, aparelhos eletrónicos e pastas devido à alta condutividade e propriedades óticas (Adhikari et al. 2015), na saúde para diagnóstico (Uchihara 2007), revestimento de dispositivos (Lajcak et al. 2013), veiculação de fármacos (Skirtach et al. 2006), material de penso (Chaudhari et al. 2016), entre outros. Consequentemente, com a ampla gama de aplicações disponíveis, estas nanopartículas têm potencial para causar um impacto significativo para a sociedade.

Na área da saúde, as NpsAg receberam uma enorme atenção por parte dos investigadores pela sua extraordinária ação antimicrobiana contra uma vasta gama de microrganismos (Mody et al. 2010). Nesta área, o uso indevido de antimicrobianos levou ao desenvolvimento de bactérias multirresistentes, que é um dos maiores desafios para os investigadores e uma ameaça global significativa (Rudramurthy et al. 2016). O desenvolvimento de resistência antimicrobiana pode ser causado por: (A) alteração ou inativação do fármaco; (B) capacidade de ligação reduzida do fármaco devido a alteração nos locais de ligação; (C) redução do efeito antimicrobiano devido à modificação das vias metabólicas; ou (D) diminuição da permeabilidade e / ou aumento

do fluxo ativo, levando a uma menor acumulação intracelular de agentes antimicrobianos (Schmieder & Edwards 2012).



Figura 1. Diagrama de algumas áreas e aplicações das NpsAg.

A principal preocupação com o desenvolvimento de resistência antimicrobiana é a disseminação de organismos resistentes e a substituição de antimicrobianos convencionais por novas tecnologias. Atualmente, as NpsAg são amplamente consideradas um agente antibacteriano alternativo aos iões de prata, porque estes últimos têm uma maior toxicidade (Jena et al. 2013). As NpsAg apresentam superfícies extremamente grandes, com diâmetros pequenos contendo 15-20.000 átomos de prata, uma grande relação superfície/volume, ou seja, aumenta a área de contacto destas com o meio que as rodeia, proporcionando maior interação com a membrana celular e fácil penetração na célula, levando à destruição completa de microrganismos (Franci et al. 2015). A Nanotecnologia impulsionada para inovar veio modernizar a Medicina e fornecer esperança na superação do problema da resistência aos medicamentos, da terapêutica mais direcionada e menos tóxica. O desempenho, a flexibilidade e as

propriedades físico-químicas levaram à síntese de moléculas orgânicas e inorgânicas de tamanho nanométrico (Wong et al. 2013). A eficácia das nanopartículas depende não só da interação entre o microrganismo e as nanopartículas, como da sua forma, dimensão e monodispersidade. O desenvolvimento de nanomateriais eficazes requer conhecimento aprofundado das propriedades físico-químicas das nanopartículas e dos aspetos biológicos dos microrganismos (Rudramurthy et al. 2016).

A síntese de NpsAg é um dos principais desafios da Nanotecnologia aplicada à saúde, existem diferentes métodos de síntese com vantagens e desvantagens em todos eles, abordadas mais à frente. Os diferentes métodos formam partículas de diferentes dimensões e morfologias, dependendo também dos agentes redutores e estabilizadores. Estes métodos podem ser categorizados em 2 grandes classes. Os métodos de síntese vulgarmente conhecidos por “*Bottom to up*” ou seja de “de baixo para cima”, onde as nanopartículas são construídas átomo a átomo através de um processo de nucleação, como a redução química que é, um dos métodos de síntese mais usados hoje em dia. Os métodos de síntese referidos como métodos “*Top to up*” ou seja "de cima para baixo", onde o método mais usado é a ablação a laser. Os lasers são pulsados no material de origem, de prata quebrando em nanopartículas. Dos métodos físicos e químicos relatados para a síntese de NpsAg, a sua maioria causa potenciais riscos ambientais e biológicos como a contaminação da água. No caso dos métodos de síntese biológica, onde se recorre a microrganismos e plantas, sendo por isso considerados processos mais económicos e ecológicos (Trefry 2011).

2. A Prata

A prata é um elemento brilhante, muito dúctil e maleável, mas ligeiramente mais duro do que o ouro, com um símbolo de Ag e número atômico de 47. Além da prata elementar, outros compostos contendo prata encontram-se na crosta terrestre incluem haletos de prata (AgBr, AgCl, AgI), entre outros. Quimicamente, a prata possui quatro diferentes estados de oxidação, Ag^0 , Ag^{1+} , Ag^{2+} e Ag^{3+} . No entanto, a prata é um elemento quimicamente inativo e em contacto com ácido nítrico ou ácido sulfúrico forma sais de prata solúveis (Firdhouse & Lalitha 2015). Ao longo da história, a prata e seus compostos têm sido usados extensivamente para muitas aplicações como resultado de suas propriedades. Nos tempos antigos, a prata foi considerada mais valiosa do que o ouro; era considerada, por isso, um símbolo de pureza (Manikprabhu & Li 2014). Evidências arqueológicas, 4000 anos aC sugerem que as civilizações usaram a prata para fazer ornamentos e decorações, os egípcios e o povo persa usavam a prata para manter a sua água limpa. Em outras culturas, vasos de prata foram usados para preservar água e vinho. Os gregos e romanos usavam a prata para armazenar produtos alimentícios. No caso da saúde, Hipócrates, proclamou que a prata continha propriedades medicinais e poderia curar doenças graças às duas propriedades antimicrobianas e antissépticas (Arvizo et al. 2012). Na Arábia, a prata foi ainda usada para tratar vertigens. Também existe a evidência do uso de nitrato de prata como agente antibacteriano na farmacopeia romana. Durante o final do século XVIII, um obstetra alemão popularizou o uso de solução profilática de nitrato de prata a 1% para a prevenção da oftalmia neonatal. Durante a Primeira Guerra Mundial, os compostos de prata foram ainda usados para prevenir as infecções de feridas. Durante meados do século XIX está ainda descrito o uso de suturas de fio de prata para reduzir a incidência de infecções bacterianas.

O uso da prata durante muitos séculos e por todo o mundo, era muito comum nas mais diversas áreas, como em utensílios para beber, comer e armazenar alimentos e bebidas (Srikar et al. 2016). No velho oeste americano, os pioneiros que viajavam ao longo das trilhas usavam a prata nos seus barris de armazenamento de água. A prata possui também uma excelente condutividade térmica e elétrica, mas na indústria elétrica têm sido limitado devido ao seu custo (Sanford & Venkatapathy 2010).

A prata sofre ionização em água, e os íons de prata bioativos interagem com proteínas e aminoácidos. Os microrganismos são altamente suscetíveis ao efeito tóxico da prata iônica, esta também inibe a replicação do ácido desoxirribonucleico (ADN) e a cadeia respiratória em microrganismos (Pal et al. 2015). No entanto, a atividade antimicrobiana da prata é diretamente proporcional ao número de íons de prata biologicamente ativo e a sua disponibilidade para interação com a parede celular bacteriana. A prata numa concentração de 75µg/mL possui uma atividade antimicrobiana de largo espectro contra bactérias, fungos e vírus (Franci et al. 2015).

3. Aplicação da Prata a nível terapêutico

A atividade antimicrobiana de NpsAg é amplamente reconhecida, embora sua atividade possa mudar com as características físicas das nanopartículas tais como a forma, a concentração, o tamanho, a composição, e as condições de sua síntese (Chung et al. 2016). As formas podem ser relevantes para sua atividade antibacteriana. As NpsAg menores, com dimensões ($< 30\text{nm}$) têm geralmente uma maior superfície de ligação e atividade antimicrobiana. A variação na espessura e composição molecular das estruturas de membrana de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas explicam a diferença para as NpsAg, ou seja, a parede celular das bactérias Gram-positivas é composta principalmente por uma camada espessa (20 a 80 nm) de peptidoglicano, forma uma estrutura rígida tridimensional, as bactérias Gram-negativas possuem uma camada fina (7 a 8 nm) de peptidoglicano, há uma falta de rigidez da estrutura geral. A rigidez não só reduz os locais de ligação da parede celular bacteriana para NpsAg, mas também tornam a parede celular mais difícil de penetrar (Pal et al. 2015).

O mecanismo exato do modo de ação das NpsAg ainda não é bem conhecido, no entanto existem várias teorias sobre a sua ação tais como: (A) as NpsAg têm a capacidade de se ligar à parede celular e, posteriormente, penetrá-la, causando alterações estruturais, como a permeabilidade da membrana celular e a morte da célula (Firdhouse & Lalitha 2015); (B) a formação de radicais livres pelas NpsAg pode ser considerada como outro mecanismo pelo qual as células morrem. Estudos de espectroscopia de ressonância de spin de elétrons sugerem que há formação de radicais livres pelas NpsAg quando em contacto com as bactérias, e esses radicais livres têm a capacidade de danificar a membrana celular e torná-la porosa podendo levar à morte celular (Prabhu & Poulouse 2012); (C) também foi proposto que pode haver libertação de iões de prata pelas nanopartículas, e esses iões podem interagir com os grupos tiol de muitas enzimas vitais e inativá-las (Matsumura et al. 2003); (D) poderá existir ainda a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) que são produzidas possivelmente através da inibição de uma enzima respiratória por iões de prata e estas atacam a própria célula (Pal et al. 2015); (E) ou, por último, pensa-se que a interação das NpsAg com o enxofre (S) e o fósforo (P) do ADN pode levar a problemas na replicação do ADN das bactérias e assim eliminá-las (Yamada et al. 2015) (Figura 2).

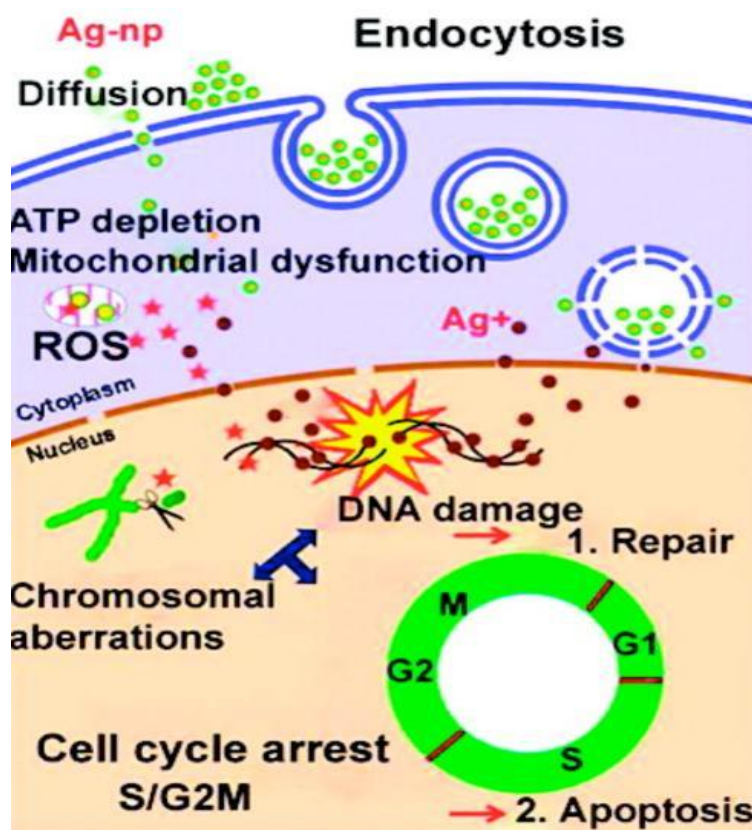


Figura 2. Esquema de possíveis mecanismos de toxicidade das NpsAg como bactericidas retirado de estudo anterior (Arcangeli et al. 2012).

A prata pode ser ainda utilizada como material de revestimento de dispositivos médicos. Pouco antes do início do século XXI, a válvula cardíaca artificial à base de silicone revestida com NpsAg foi feita para prevenir a infecção bacteriana na válvula de silicone e para reduzir a resposta inflamatória que ocorre após a cirurgia. Outros exemplos incluem a Silverline® e o Silver Soaker® que são dois cateteres médicos comercialmente disponíveis que contêm NpsAg, como materiais de revestimento de superfície para prevenir infecções. De facto, sabe-se que os cateteres médicos são muito suscetíveis a infecções bacterianas, que pode rapidamente espalhar-se e levar a sérias complicações. Devido às suas propriedades antibacterianas, as NpsAg podem diminuir a incidência de infecção bacteriana e as complicações após a cirurgia (Xing et al. 2014).

As NpsAg têm sido amplamente exploradas pelo seu potencial antimicrobiano contra bactérias Gram-negativas (Sondi & Salopek-Sondi 2004) e Gram-positivas (Shahverdi et al. 2007). Estas apresentam ação antibacteriana de largo espectro contra *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. O efeito das NpsAg tem interesse no tratamento, profilaxia e controlo de infecções. O seu desenvolvimento pode ser uma alternativa aos

antibióticos convencionais, com especial importância em bactérias multirresistentes (Silva Santos et al. 2016). As NpsAg desempenham um papel importante na cicatrização de feridas com base nas propriedades antimicrobianas da prata. No entanto, a resposta inflamatória é um componente importante da cicatrização de feridas, dentro das feridas, vários mediadores inflamatórios são segregados para modular o processo de cicatrização (Dennis et al. 2013). No processo de cicatrização de feridas, a resposta inflamatória prolongada é, sem dúvida, um obstáculo para a cura. Um mediador vital neste processo anti-inflamatório em cascata é IL-10, que pode ser produzida por queratinócitos, bem como células inflamatórias envolvidas no processo de cicatrização, incluindo linfócitos T, macrófagos e linfócitos B. Uma das únicas ações da IL-10 é sua capacidade de inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias (Tian et al. 2007). Os pensos com NpsAg são utilizados para a cicatrização de feridas, queimaduras, úlceras de pressão e lesões traumáticas. Estes pensos variam na sua composição, podendo apresentar diversos componentes tais como poliéster, hidrocolóide ou metilcelulose (Ip et al. 2006). O Acticoat[®] é um dos pensos comercialmente disponíveis composto por um núcleo de poliéster contendo diversas camadas de NpsAg dispostas de diferentes formas que são libertadas e entram nas células como aglomerados (Fong & Wood 2006). Estudos *in vitro* mostram que o tratamento com NpsAg reduza a atividade mitocondrial, mas estes sistemas parecem não afetar a viabilidade celular. Daí a libertação das NpsAg pode ser definida como tóxica para as mitocôndrias, causando uma redução temporária da atividade metabólica na célula, sem causar a morte celular. As células permanecem viáveis e são capazes de proliferar uma vez que a prata leva à reconstrução do tecido dérmico *in vivo*, reduzindo assim o risco de infecção nosocomial, bem como o custo dos cuidados, diminuindo o número de dias de tratamento e danos nos tecidos, melhorando definitivamente a adesão do doente aos tratamentos (Rigo et al. 2013).

Os mecanismos da atividade antiviral das NpsAg são também um aspeto importante na terapia antiviral. As NpsAg têm interações únicas com os vírus e estas são dependentes de tamanho, sendo que as menores com dimensões entre 10-20 nm de diâmetro demonstraram um maior potencial antiviral (Galdiero et al. 2011). Nesta área, as NpsAg demonstraram ser ativas contra vários tipos de vírus, incluindo o vírus da sida (Elechiguerra et al. 2005), o vírus da hepatite B (Trefry 2011), o vírus do herpes *simplex* (Gaikwad et al. 2013) e o vírus da gripe (Xiang et al. 2013), o mecanismo de ação ainda não é bem conhecido. Os mecanismos sugeridos para os efeitos antivirais das NpsAg

resultam de várias teorias tais como a produção de ROS, a interrupção do potencial de membrana, danos no ADN, todos estes mecanismos são processos a longo prazo que requerem um metabolismo ativo que não está presente nos vírus. Embora as células hospedeiras possam ser afetadas por os mecanismos mencionados anteriormente, tais mecanismos são improváveis que sejam a causa de inibição precoce da infeção viral devido aos longos tempos de exposição exigidos para estes factos. O mecanismo mais provável da atividade antiviral é a ligação das NpsAg a proteínas virais e a inativação ou diminuição da sua função numa fase inicial da infeção (Trefry 2011).

As NpsAg na terapia oncológica é usada como adjuvante para fins de diagnósticos e terapêuticos. No campo da engenharia biomédica foi desenvolvido um nanossensor ótico usando uma matriz de NpsAg para a deteção da p53 que é uma proteína supressora de tumor presente nos seres humanos e é codificada pelo gene TP53. Quando os tumores se desenvolvem, as mutações pontuais no gene TP53 podem levar à expressão aumentada das proteínas p53, que contribuem para a divisão celular contínua. A deteção da proteína p53 sérica pode desempenhar um papel importante no diagnóstico de tumores (Haes & Van Duyne 2002; Zhou et al. 2011). Outra aplicação inclui o desenvolvimento de NpsAg revestidas com ácido fólico (FA). As FA-AgNPs foram conjugadas com Doxorrubicina por ligação electroestática, é um antibiótico do grupo das antraciclinas, utilizado no tratamento de vários tipos de cancro. A Doxorrubicina a 1µM foi libertada de forma eficiente ocorrendo morte celular (Encarnacion & Rosado 2016). O uso terapêutico das NpsAg com sistemas de veiculação para uma administração direcionada, menos tóxica, e como adjuvantes na radioterapia é uma aplicação muito recente e com resultados muito promissores. Outro exemplo inclui as NpsAg lipofílicas aprisionadas em nanopartículas poliméricas baseadas em PEG contendo clorotoxina (Drbohlavova et al. 2013). Estes sistemas demonstraram um aumento da captação celular e efeito citotóxico. Estas NpsAg demonstraram ainda ter importantes propriedades antiangiogénicas, onde são conhecidas pela sua potencial capacidade para bloquear a atividade de proteínas sinalizadoras anormalmente expressas. Este facto é consistente com o efeito de NpsAg na viabilidade celular durante o fator de crescimento endotelial vascular induzido angiogénese nas células endoteliais da retina, inibindo deste modo o desenvolvimento de distúrbios ou complicações da retina angiogénica (Sriram et al. 2010).

4. Métodos de preparação de NpsAg

Atualmente a Nanotecnologia está focada na síntese controlada de NpsAg com diferentes morfologias, dimensões, composição química e controle da sua dispersão para aplicações médicas. As NpsAg podem ser sintetizada por diversos métodos apresentando-se normalmente como uma suspensão coloidal de cor amarela. A espectroscopia UV-Visível é o método mais usado para a sua caracterização, observando-se uma banda característica entre 380 e 450 nm. Para uma produção de NpsAg bem-sucedida são considerados vários fatores como o tempo de reação, as taxas de mistura, a ordem da adição, a concentração, o volume de espécies reagentes, a temperatura e pH do meio. Estes fatores afetam a forma, o tamanho, a estabilidade, a reologia, a cristalinidade, a estrutura, a nucleação e, subsequentemente, o crescimento das NpsAg (Swai 2016).

4.1. Métodos físicos

Os métodos físicos mais aplicados para a produção de NpsAg são a evaporação-condensação e a ablação a laser. A ausência de contaminação por solventes e a uniformidade da distribuição de nanopartículas são algumas das vantagens dos métodos de síntese física em comparação com os métodos químicos (Natsuki et al. 2015).

Evaporação-condensação

A produção de NpsAg por evaporação-condensação é realizada num forno tubular à pressão atmosférica. A solução aquosa contendo prata é colocada no recipiente no centro do aquecimento. Os elementos são evaporados e transportados pelo gás transportador, deixando apenas as NpsAg no forno. A técnica de evaporação-condensação é fácil e direta. No entanto, esta técnica tem algumas desvantagens: o forno tubular ocupa um grande espaço, tem um elevado consumo de energia enquanto aumenta a temperatura ambiental em torno do material de origem e requer cerca de uma hora para atingir estabilidade térmica (Iravani et al. 2014).

Ablação a laser

A ablação a laser do material macroscópico da prata é outro método físico muito promissor para a preparação de partículas de colóides de prata. As vantagens deste

método são variadas tais como a facilidade do processo, a versatilidade em relação à identidade do metal ou a utilização de solventes puros sem o uso de tampões ou estabilizadores, bem como a ausência de resíduos de agentes químicos aditivos. Neste caso, as NpsAg são obtidas por incidência do feixe de laser sobre as placas de prata imersas na solução. As NpsAg preparadas por este método são quimicamente puras e a sua dimensão varia entre 30-40 nm, dependendo do comprimento de onda, da intensidade do laser utilizado, do tempo de radiação e do solvente no qual a radiação incide. Existe uma relação entre o tamanho das NpsAg e o comprimento de onda do laser. O tamanho das NpsAg aumenta linearmente com a potência do feixe do laser (Tsuji et al. 2002).

Descarga de arco

Além dos métodos acima mencionados, outro método utilizado é a descarga de arco, sem quaisquer tensioativos ou estabilizadores. Neste caso foram utilizados elétrodos de prata, ânodo e cátodo em água pura. Durante a descarga, a camada superficial dos fios de prata é evaporada e condensada, obtendo-se assim NpsAg estáveis, bem dispersas e de tamanhos compreendidos entre 10-20 nm (Tien et al. 2008).

As NpsAg podem ser ainda sintetizadas por evaporação / condensação mas utilizando um pequeno aquecedor de cerâmica para fornecer calor contínuo sem qualquer flutuação, onde os metais de origem podem ser evaporados. As NpsAg apresentaram-se estáveis devido a temperatura de superfície do aquecedor que não flutua com o tempo sintetizando nanopartículas monodispersas e de morfologia esférica (Jung et al. 2006). Estes métodos não só reduzem o tempo de preparação como também o consumo de energia, apesar das técnicas físicas para a preparação de NpsAg não estar comprometida a pureza das partículas nem o tamanho. No entanto, o custo é considerado o principal obstáculo porque necessita de equipamentos dispendiosos (Tran et al. 2013).

4.2. Métodos químicos

O método mais comum de síntese é a redução química em soluções aquosas, mas existem outros métodos de produção, tais como métodos químicos assistidos por radiação, técnicas eletroquímicas. As vantagens destes métodos de produção de NpsAg são a facilidade de produção, baixo custo e o alto rendimento (Zhang et al. 2016).

Assistidos por radiação gama

Na síntese de NpsAg pela ação da radiação gama é aplicada uma radiação direta numa solução aquosa de sal de prata. Durante a radiação gama há indução de ionização e excitação do solvente aquoso de sal de prata sob atmosfera de gás hidrogênio, formam-se eletrões hidratados e átomos de hidrogénio, que reduzem os iões de prata. Concomitantemente, formam-se radicais hidroxilo, que oxidam partículas de prata. Na presença de gás hidrogénio uma parte dos radicais hidroxilo reage com a molécula de hidrogénio produzindo átomos de hidrogénio, que contribuem para a redução do ião de prata. Pela ação desta oxidação simultânea das partículas de prata/redução de iões de prata é conseguido um crescimento gradual. Os defeitos estruturais são minimizados e são sintetizadas nanopartículas dispersas com um tamanho médio de 7 nm (Prucek et al. 2004; Zheng 2011).

Assistidos por radiação ultravioleta

A síntese de NpsAg pela ação da radiação ultravioleta (UV) este método químico tem a vantagem do equipamento experimental ser mais simples e rentável. A lâmpada de descarga de mercúrio é frequentemente utilizada como fonte de radiação UV. A mistura reacional além do nitrato de prata contém 2-propanol, acetona e um estabilizador polimérico, a polietilenoimina. A incidência UV gera radicais cetílicos via excitação da acetona e subsequente abstração de átomos de hidrogénio 2-propanol. Estes radicais são redutores fortes, desaparecem por reagir uns com os outros ou com os iões de prata, resultando da formação das NpsAg (Natsuki et al. 2015). Outro exemplo refere-se à gelatina que atua como um estabilizador na síntese de NpsAg e um meio para Ag^+ . Após a preparação por radiação UV, as partículas preparadas são dissociadas através da radiação para formar partículas menores estabilizadas pelos grupos pendentes da amina da estrutura química da gelatina, conduzindo à formação das NpsAg. Este método de redução envolve normalmente a decomposição da água pela radiação ionizante, o que proporciona uma via eficaz para reduzir os iões metálicos. Usando este método, as soluções aquosas são expostas à radiação UV e os eletrões solvatados podem ser produzidos. Por sua vez, os eletrões solvatados produzem os catiões metálicos para os átomos metálicos e finalmente coalescem para formar as NpsAg estabilizadas pela gelatina com distribuição de tamanho médio de 20 nm (Darroudi et al. 2011).

Eletroquímico

A síntese de NpsAg pelo método eletroquímico permite a obtenção de partículas com elevada pureza, utilizando procedimentos simples e rápidos. É possível controlar o tamanho e melhorar a homogeneidade de NpsAg mudando a composição das soluções eletrolíticas. Este método recorre a etanol, água desionizada ou a diferentes estabilizadores (eletrostáticos ou estéricos) que podem ser monómeros orgânicos ou polímeros respetivamente, evitando a utilização de produtos químicos. A redução química por polímeros permitem controlar a forma e o tamanho das nanopartículas por mudança do comprimento da cadeia de polímero (Roldán et al. 2013). Na síntese eletroquímica de NpsAg, a célula é mantida num banho de ultrassons com a intensidade de corrente constante onde há uma competição entre dois processos de superfície diferentes: a formação das partículas e a deposição da prata no cátodo. A chave para a síntese eletroquímica das NpsAg em meio aquoso é forçar as partículas reduzidas a abandonar a superfície do cátodo (Figura 3) (Khaydarov et al. 2009).

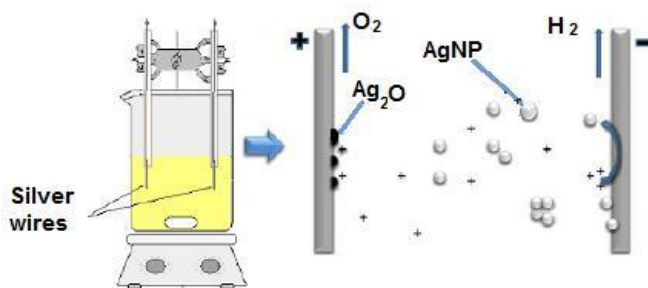


Figura 3. Imagem ilustrativa da síntese das NpsAg pelo método eletroquímico retirada de (Blandón et al. 2012). 1. Dissolução oxidativa do ânodo de Ag; 2. Libertação do O_2 devido à electrólise da água, com deposição Ag_2O na superfície do ânodo; 3. Migração dos iões para o cátodo, redução Ag^+ , libertação do H_2 ; 5. Formação das NpsAg via nucleação e crescimento devido a forças atrativas de Van der Waals entre átomos de Ag; 6. Separação de NpsAg sintetizadas do cátodo causada por agitação vigorosa da solução.

No método eletroquímico para a síntese de NpsAg com polietilenoglicol (PEG) forma-se partículas estáveis e suficientemente permeáveis que permitir a difusão de pequenas moléculas. O PEG atua com agente estabilizador e influencia os processos do eletrodo onde se dá o varrimento no sentido da oxidação e neste caso quase toda a prata reduzida é oxidada. Na solução, os iões de prata reduzidos foram divididos, isto é, uma parte foi

depositada na superfície do eletrodo, enquanto outra foi reduzida a nanopartículas e estabilizada por PEG. Assim, quando a varrimento se faz no sentido da oxidação, apenas a prata depositada vai ser oxidada novamente. Aqui, há um aumento efetivo da formação de nanopartículas e uma redução da eletrodeposição na superfície do eletrodo (Li et al. 2013). Outra forma é a aplicação de um cátodo rotativo de platina e a deposição das NpsAg e transfere rapidamente as NpsAg da vizinhança do cátodo para a solução, evitando a ocorrência de aglomerados na vizinhança do cátodo e assegura a monodispersão das partículas. A adição de um surfactante de dodecil benzeno sulfonato de sódio ao eletrólito melhorou o tamanho das nanopartículas e a distribuição destas (Iravani et al. 2014).

Assistidos por micro-ondas

Os métodos assistidos por micro-ondas utilizam uma faixa de frequência entre 300 MHz a 300 GHz. A vantagem relaciona-se com o aumento da cinética de reação, por um rápido aquecimento inicial, aumentando a formação das nanopartículas monodispersas distribuídas uniformemente. Com este método foram sintetizadas NpsAg com carboximetilquitosano, que é um derivado comum, do grupo carboximetilo de introdução nos grupos hidroxilo e amina, possui solubilidade em soluções alcalinas e tem maior capacidade de absorção de íons metálicos do que o quitosano, que possui fraca solubilidade em soluções alcalinas e neutras que é usado pela sua flexibilidade de cadeia aumentada e concentrações mais altas de grupos quelantes. Daí o interesse em estudar a formação de NpsAg com carboximetilquitosano como material de matriz (Wang et al. 2010). Quando misturado com a solução de carboximetilquitosano, os íons de Ag^+ ligam-se às cadeias das macromoléculas através de interações eletrostáticas; o carboximetilquitosano interage com íons Ag^+ e formam um complexo carboximetilquitosano- Ag^+ . Com aquecimento por micro-ondas, a redução contínua de Ag^+ para Ag^0 estimula a síntese de NpsAg monodispersas. Outro exemplo deste método é a síntese de NpsAg com Carboximetilcelulose sódica (CMC) como agente redutor e estabilizador. O tamanho das nanopartículas depende da concentração de CMC e AgNO_3 . O aquecimento por micro-ondas promove a hidrolisação parcial da CMC, produzindo a aldose como hidrolisado final, que pode reduzir a prata iônica (Ag^+) para átomos de prata (Ag^0). Com a hidrolisação as NpsAg crescem gradualmente e CMC irá ainda formar uma camada de proteção estável sobre a superfície das NpsAg. A CMC

em alta concentração promoverá a formação de Ag_2O a partir de AgNO_3 , o que irá perturbar o crescimento de NpsAg (Chen et al. 2008; Polshettiwar et al. 2009).

Redução química

A abordagem mais comum para a síntese de NpsAg é por redução química com recurso a agentes redutores orgânicos e inorgânicos, a diferentes temperaturas e concentrações, tais como; citrato do sódio, ácido ascórbico, borohidreto de sódio (NaBH_4), glucose, hidrazina (Guzmán et al. 2008; Kheybari et al. 2010). Neste caso existe a redução da Ag^+ em soluções aquosas ou solventes orgânicos. A redução de vários complexos com Ag^+ leva à formação de Ag^0 , a nucleação que é seguida de coalescência e posterior crescimento (Figura 4). Além disso, a geometria, o tamanho uniforme e a monodispersão de tamanhos pode ser conseguida controlando a nucleação através de parâmetros experimentais como a temperatura da reação, as diferentes concentração dos agentes redutores e estabilizadores, o tempo de reação e o pH (Haider & Kang 2015; Wiley et al. 2005).

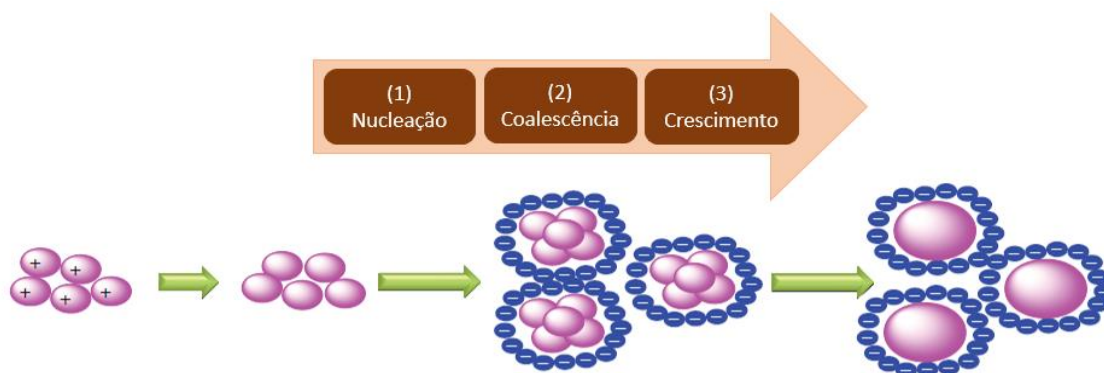


Figura 4. Esquema demonstrativo da formação das NpsAg retirado de (Haider & Kang 2015). O primeiro passo é a redução de Ag^+ e a formação de pequenos núcleos. Os núcleos instáveis agregam-se espontaneamente e transformam-se em agregados maiores e subsequente crescimento.

Os agentes redutores fortes sintetizam as NpsAg no início do processo, impedindo a formação de partículas maiores e reduzindo o tempo de crescimento (Abou El-Nour et al. 2010). Em agentes redutores fracos por vezes é importante usar agentes estabilizadores durante a síntese para proteger as partículas da sedimentação, perda de propriedades superficiais e melhor controlo na dimensão das NpsAg. Alterando a proporção do agente estabilizador com o AgNO_3 , obtêm-se tamanhos e formas de partículas diferentes. Os compostos poliméricos como polivinilpirrolidona (PVP),

poliálcoolvinílico (PVA), polietilenoglicol (PEG), incluindo surfactantes como dodecil sulfato de sódio (SDS) foram descritos como agentes protetores eficazes para estabilizar nanopartículas, mas também atuam como agentes redutores (Sun & Xia 2002).

4.3 Métodos que recorrem a microrganismos e outros

A preparação de NpsAg com bactérias, fungos e plantas foi designada “síntese verde” é mais ecológica e económica (Ahmad et al. 2015). O avanço da “síntese verde” de NpsAg está a progredir como um ramo chave da Nanotecnologia, onde o uso de bactérias, fungos e extratos vegetais para a produção de nanopartículas pode ser uma alternativa aos métodos químicos e físicos. A biossíntese de NpsAg é uma abordagem ascendente que envolve principalmente reações de redução/oxidação isto é, os enzimas microbianos e os metabolitos vegetais, como por exemplo o nitrato redutase, terpenóides, saponinas, flavonas e amidas com propriedades redutoras e/ou estabilizadoras que sintetizam as NpsAg (Sabri et al. 2016). As nanopartículas podem ser sintetizadas intracelular ou extracelularmente. A síntese de NpsAg intracelular requer etapas adicionais como ultrassons ou solventes para purificar as nanopartículas sintetizadas. A biossíntese extracelular é barata e requer um processo mais simples. Tal facto favorece a produção em larga escala de NpsAg para explorar as suas potenciais aplicações (Das et al. 2013).

Bactérias

A síntese de NpsAg utilizando bactérias formam-se por redução de iões de prata aquosos com o sobrenadante ou *pellet* da cultura de bactéria não patogénica (*Bacillus sp.*), extra e intracelularmente, respetivamente (Das et al. 2013). Os mecanismos envolvidos na síntese intracelular de nanopartículas são os seguintes: a parede celular do microrganismo, carregada negativamente, interage electrostaticamente com os iões metálicos carregados positivamente, em seguida, os enzimas presentes na parede celular reduzem os iões metálicos. A vantagem desta síntese é o tamanho das NpsAg e a sua monodispersão, mas precisam de ultrassons ou reação com solventes apropriados. Além desta *Bacillus sp.* utilizou-se a *Pseudomonas stutzeri*. Neste caso foram produzidas NpsAg de 35-45 nm de tamanho no espaço periplásmico da célula. Embora a síntese

intracelular seja possível, a maioria delas são difíceis de implementar para uso industrial devido ao processo de recuperação. Neste sentido, a síntese extracelular de NpsAg é o foco de interesse (Manikprabhu & Li 2014). Os microrganismos podem então atuar como agentes redutores e protetores na síntese de NpsAg. A redução de íons Ag^+ por combinações de biomoléculas como enzimas/proteínas, aminoácidos e polissacáridos, que já se encontram estabelecidas com valores terapêuticos, requerem uma atenção especial porque as bactérias que sintetizam as NpsAg também são vulneráveis a maiores concentrações dos íons de prata como acontece com o *Bacillus licheniformis* que é um dos organismos usados para sintetizar NpsAg e dependendo da concentração do íon de prata assim sintetiza (1 mM) ou pode provocar morte celular (10 mM) (Deepak & Kalishwaralal 2011).

O mecanismo amplamente aceite para a síntese de NpsAg é a presença do enzima nitrato redutase (Figura 5). O nitrato redutase é um enzima do ciclo do nitrogénio responsável pela conversão do nitrato em nitrito. A redução mediada pela presença da enzima no organismo é responsável pela síntese. O uso de um enzima específico NADH dependente do nitrato redutase na síntese *in vitro* de nanopartículas foi descrito no organismo *B. licheniformis*. Durante a catálise, o nitrato é convertido em nitrito, e um eletrão é transferido para o Ag^+ , sendo responsável pela redução para Ag^0 e a subsequente formação de NpsAg (Velusamy et al. 2016).

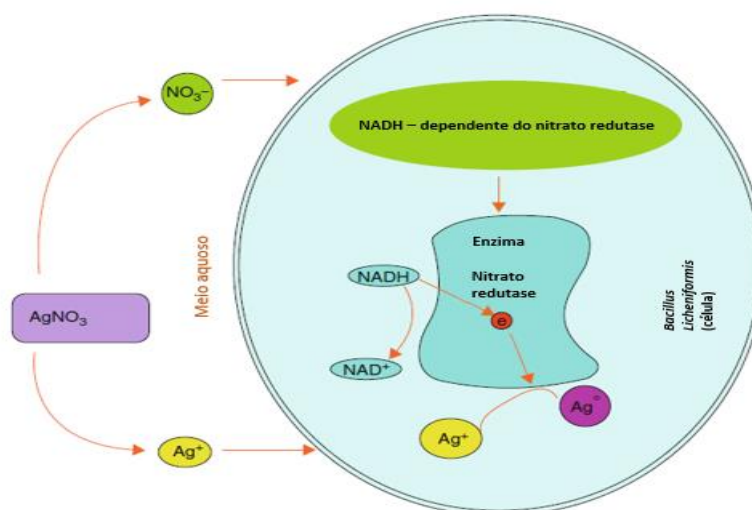


Figura 5. Esquema do mecanismo de ação da síntese de NpsAg pelo enzima nitrato redutase pelas bactérias e fungos retirado de (Deepak & Kalishwaralal 2011).

Fungos

A aplicação dos fungos na síntese de NpsAg em comparação com as bactérias é mais vantajosa na medida que tem maior facilidade na produção em larga escala e viabilidade económica. Além disso, a presença de micélios oferece maior resistência e uma área superficial aumentada. Os fungos podem produzir maiores quantidades de NpsAg porque secretam maiores quantidades de proteínas aumentando a produtividade destas, tendo grande potencial para a indústria (Velusamy et al. 2016). *Trichoderma reesei* têm a capacidade de produzir metabolitos extracelulares como glucosidase, hemicelulase e a enzima lítica da parede celular que o protegem quando expostos a agressões ambientais como materiais tóxicos (Ag^+) e variações de temperatura. O micélio do fungo é exposto à solução de AgNO_3 e produz enzimas e metabólitos para sua própria sobrevivência, reduzindo os iões de prata e levando à formação das NpsAg, com tamanho que varia entre 5-50 nm (Vahabi et al. 2011). Os fungos também podem produzir naptoquinonas e antraquinonas que atuam como agentes redutores. O fungo marinho *Aspergillus flavus* sintetizou NpsAg intracelular em pH ácido, enquanto que o mesmo fungo em pH alcalino sintetizou NpsAg extracelularmente. Tal facto sugere que a síntese sobre NpsAg poderá ser dependente do pH (Vigneshwaran et al. 2007). O mecanismo amplamente aceite para a produção de NpsAg é a presença do enzima nitrato redutase, que também acontece com os fungos como o *Fusarium oxysporum* onde foram produzidas NpsAg extracelularmente, com uma gama de tamanhos compreendidas entre 5-15 nm. (Abdulaziz et al. 2015).

Outros:

Animais

Outra fonte natural plausível para a biossíntese de NpsAg é um produto natural do corpo do inseto *Dactylopius coccus*. O ácido carmínico é um pigmento vermelho natural produzido a partir de corpos secos da espécie feminina com uma atividade notável como um eliminador de radicais comparável aos antioxidantes conhecidos como quercetina e o ácido ascórbico. A presença de moléculas de carminato em torno dos átomos de prata promove a monodispersão e forma nanopartículas esféricas com o tamanho de 15-40 nm (Goudarzi et al. 2016).

Plantas

A principal vantagem nos extratos de plantas para sintetizar NpsAg é estar facilmente disponível, mais económico, seguros e não tóxicos na maioria dos casos. Além disso, estes possuem uma ampla gama de metabolitos que podem ajudar na redução de iões de prata, sendo por isso um processo mais rápido do que os microrganismos na síntese. O processo de redução por plantas é devido a metabolitos vegetais. Os principais metabolitos envolvidos são terpenóides, flavonas, alcalóides, taninos, saponinas, cetonas, aldeídos, amidas e ácidos carboxílicos (Kulkarni & Muddapur 2014). O mecanismo exato para a síntese de nanopartículas ainda não foi bem descrito, mas sugere-se que se decorra devido à presença de fatores redutores e protetores nas biomoléculas que atuam como um fator de síntese. Acredita-se que a variação na composição e concentração destes metabolitos entre diferentes plantas e a sua interação com iões de prata sejam os principais fatores contribuintes para a diversidade de tamanhos e formas de nanopartículas produzidas. A síntese de nanopartículas usando plantas pode ser intracelular como extracelularmente. O método intracelular para a síntese de nanopartículas incluem plantas cultivadas em solos ou outros meios enriquecidos em metais orgânicos (Marchiol et al. 2014); enquanto que o método extracelular inclui o uso de extratos preparado por ebulição ou esmagamento de diferentes partes das plantas tais como folhas, frutas, cascas, sementes, raízes e caules (Rai & Yadav 2013). A Tabela 1 descreve vários exemplos de plantas usadas na síntese de NpsAg. O protocolo para a sínteses envolve a recolha da parte da planta de interesse, lavagem para remover detritos associados, maceração com água destilada e posteriormente filtrar a infusão. Com a adição de poucos mililitros do extrato vegetal à solução de AgNO_3 ocorre a alteração da coloração de verde para castanho devido à redução dos Ag^+ em Ag^0 formando-se as NpsAg. A síntese extracelular de NpsAg por meio de extração é um processo rápido e simples (Ahmed et al. 2016). A morfologia e a dimensão das NpsAg podem ser modificadas por uma ligeira alteração do pH e da temperatura. O solvente de primeira escolha para extrair os agentes redutores da planta é a água na maioria dos casos; no entanto, também se usa solventes orgânicos como metanol, etanol e a acetona (Srikar et al. 2016).

Outro exemplo refere-se à *Ocimum sanctum* que é uma planta medicinal tradicional da Índia e contém alcalóides, glicosídeos, taninos, saponinas e compostos aromáticos que atuam como redutores e estabilizadores. *Cycas*, que pertence à família *Cycadaceae*, é

uma planta gimnospérmica é rica em flavonóides pertence à classe de fenólicos compostos. Ambas podem produzir NpsAg esféricas e com tamanho médio de 6 nm (Jha & Prasad 2010). O extrato das folhas da *Rosa damascena* foi também utilizado como redutor pelos compostos fenólicos para reduzir o AgNO_3 , levando à síntese de NpsAg num único passo, sem o uso de quaisquer agentes adicionais (Ahmad et al. 2015). Além disso, o extrato de pó de tubérculo de *Curcuma longa* foi ainda utilizado na síntese de NpsAg com um diâmetro médio 6 nm e com uma estrutura cúbica (Shameli et al. 2012).

Citrus limon é uma rica fonte de ácido cítrico e ácido ascórbico, ambos atuam como agentes redutores para iões Ag^+ . Além disso, ácido cítrico tem uma ação tampão. Neste caso formaram-se NpsAg de forma esférica e cujo tamanho variou entre 10-30 nm. A adição de NaOH leva a um aumento da ação redutora do ácido ascórbico (Mohapatra et al. 2015).

Outro exemplo refere-se à síntese de NpsAg a partir do extrato de pó do fruto *Vaccinium myrtillus* vulgarmente conhecido como mirtilo. Este é rico em flavonoides como os antocianósidos, em ácidos fenólicos e triterpenóides. Pensa-se que primeiro existe a transferência da carga dos agentes redutores para Ag^+ resultando na formação de átomos Ag^0 . De seguida, acontece a nucleação e forma nanopartículas pequenas. Posteriormente, ocorre a condensação no qual as pequenas partículas crescem para formar maiores, seguidos pela redução da superfície de Ag^+ das nanopartículas formadas. O terceiro passo envolve a adsorção de excesso de iões de agentes redutores carregados negativamente na superfície das nanopartículas formadas, conseguindo estabilidade eletrostática e controlo no tamanho (Ashour et al. 2015).

Portulaca oleracea também conhecida como beldroega é usada em saladas e sopas. Esta contém nutrientes, vitaminas, minerais (especialmente potássio), ácidos gordos, glutathione, ácido glutâmico e ácido aspártico. A presença destes grupos funcionais é responsável pela estabilização das NpsAg sintetizadas a partir do extrato aquoso das folhas frescas de *Portulaca oleracea* e atua também como agente redutor e tampão (Synthesis et al. 2013).

Além desta, existe a *Eclipta prostrata* que cresce em lugares húmidos como uma erva daninha em climas temperado e tropical em todo o mundo e neste caso prepara-se o extrato a partir das folhas (Swaminadham et al. 2014).

Finalmente, o extrato da raiz de *Glycyrrhiza glabra* que é composto por glicirrizina, ácido glicirretínico, asparagina, flavonóides e terpenóides, é igualmente aplicado na síntese das NpsAg. Os seus metabolitos são responsáveis pela redução dos Ag^+ . As nanopartículas resultantes apresentam forma quase esférica e um tamanho entre 20-30 nm (Dinesh et al. 2012).

Tabela 1. Resumo das características das plantas para a síntese de NpsAg.

Planta	Dimensão (nm)	Parte da planta	Morfologia	Referências
<i>Adiantum philippense</i>	15	Folhas	Esférica	(Sant et al. 2013)
<i>Curcuma longa</i>	7	Tubérculos	Cubica	(Shameli et al. 2012)
<i>Ocimum sanctum</i>	6	Folhas	Esférica	(Mallikarjuna et al. 2011)
<i>Aloe vera</i>	15	Folhas	Esférica	(Chandran et al. 2006)
<i>Cycas</i>	6-8	Folhas	Esférica	(Jha & Prasad 2010)
<i>Rosa damascena</i>	20	Folhas	Esférica	(Ahmad et al. 2015)
<i>Citrus limon</i>	10-30	Fruto	Esférica	(Mohapatra et al. 2015)
<i>Vaccinium myrtillus</i>	1,4-8,6	Fruto	Esférica	(Ashour et al. 2015)
<i>Artemisia princeps</i>	20	Folhas	Esférica	(Gurunathan et al. 2015)
<i>Portulaca oleracea</i>	50-60	Folhas	Esférica	(Synthesis et al. 2013)
<i>Eclipta prostrata</i>	15	Folhas	Cúbica	(Swaminadham et al. 2014)
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	20-30	Raiz	Esférica	(Dinesh et al. 2012)

5. Procedimento experimental

Durante as unidades curriculares de Projeto I e II tive a oportunidade em integrar um projeto de investigação onde o objetivo principal incluía a preparação de NpsAg através de diferentes métodos. Neste caso sintetizaram-se NpsAg com diferentes agentes redutores: a) por redução da prata com ácido ascórbico e com diferentes agentes estabilizadores, PVP e PVA; b) citrato de sódio a 1% descritos anteriormente (El-kheshen & El-rab 2012), c) NaBH_4 a 2 mM descrito por (Mulfinger et al. 2007). Posteriormente, as NpsAg com menor tamanho e mais monodispersas foram sujeitas a experiências adicionais que incluíram a associação de um antibiótico às NpsAg. Neste caso foi utilizada a ampicilina como fármaco modelo. A formação de nanopartículas de prata foi observada por uma mudança de cor, uma vez que formam cor amarela na síntese (Figura 6).

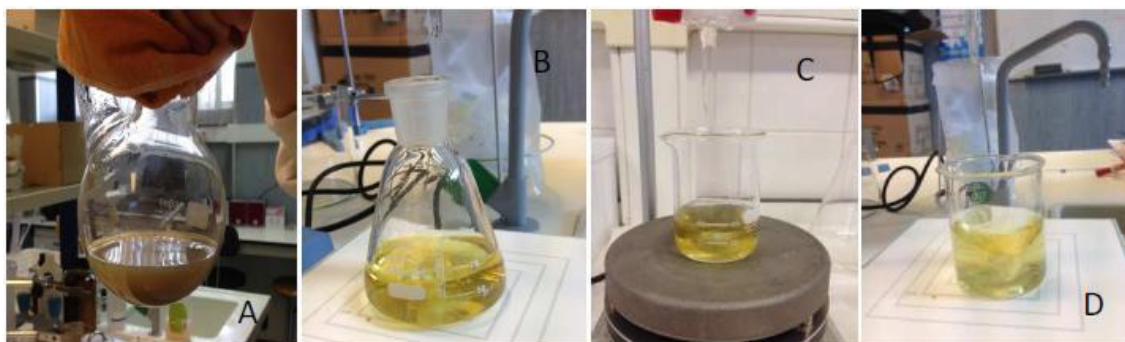


Figura 6. Imagens obtidas na síntese de NpsAg em laboratório. (A) NpsAg por redução com citrato à ebulição, (B) NpsAg por redução com NaBH_4 em gelo (C) NpsAg por redução com ácido ascórbico com PVP à temperatura ambiente e (D) NpsAg por redução com ácido ascórbico com PVA à temperatura ambiente.

Materiais

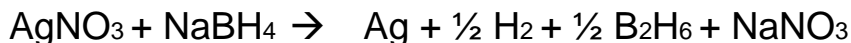
O nitrato de prata, NaBH_4 , citrato de sódio, PVA, ampicilina e o ácido ascórbico foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A PVP foi adquirida à VWR (Radnor, PA, EUA). Os restantes reagentes foram de grau analítico.

Métodos de preparação

As nanopartículas de prata foram preparadas pelo método de redução química com NaBH_4 a 2 mM em gelo e o AgNO_3 a 1 mM. Esta solução foi adicionada gota a gota

sobre a solução de NaBH₄ recorrendo a uma velocidade de agitação de 400 rpm numa placa magnética (Stuart US152, Staffordshire, Reino Unido) durante 10 minutos.

A reação química do nitrato de prata com NaBH₄ é dada por:



Observou-se a mudança de cor de incolor para amarelo claro, indicativa da formação das NpsAg. Caracterizou-se ainda esta solução por espectroscopia de absorção UV-Visível (UV-visível espectrofotómetro, o Evolution 300, Hertfordshire, Inglaterra) com o comprimento de onda 420 nm.

As NpsAg foram ainda sintetizadas pelo método de redução química com citrato de sódio a 1% (m/V). A solução do citrato foi mantida à ebulição recorrendo a uma velocidade de agitação de 300 rpm.

A reação química da prata com o citrato de sódio é dada por:



A suspensão obtida revelou ser estável provavelmente devido à presença da camada de citrato que cobre as superfícies das NpsAg (Sanford & Venkatapathy 2010). Caracterizou-se por espectroscopia de absorção UV-Visível com o comprimento de onda 430 nm.

Sintetizaram-se ainda as NpsAg pelo método de redução química com ácido ascórbico e com dois agentes estabilizadores, PVP e PVA. As soluções aquosas preparadas de AgNO₃ e ácido ascórbico estavam na mesma proporção molar de 1:1. Foram adicionadas gota a gota, à temperatura de 25°C com velocidade de agitação de 400 rpm. Observou-se a mudança de cor de incolor para amarelo claro, sugestiva da formação das NpsAg. Caracterizou-se esta solução por espectroscopia de absorção UV-Visível com o comprimento de onda 420 nm (UV-visible spectrophotometer, Evolution 300, Hertfordshire, Reino Unido).

O estudo do tamanho e distribuição de tamanhos das NpsAg foram efetuados por espectroscopia de correlação fotónica. Os resultados encontram-se descritos nas Figuras 7 e 8 e na Tabela 2. As NpsAg mais pequenas e mais monodispersas foram obtidas com

citrato de sódio e NaBH_4 , ambas sem agentes estabilizantes. Estas NpsAg demonstraram ser estáveis, quando armazenadas no frio em frasco âmbar durante 9 meses.

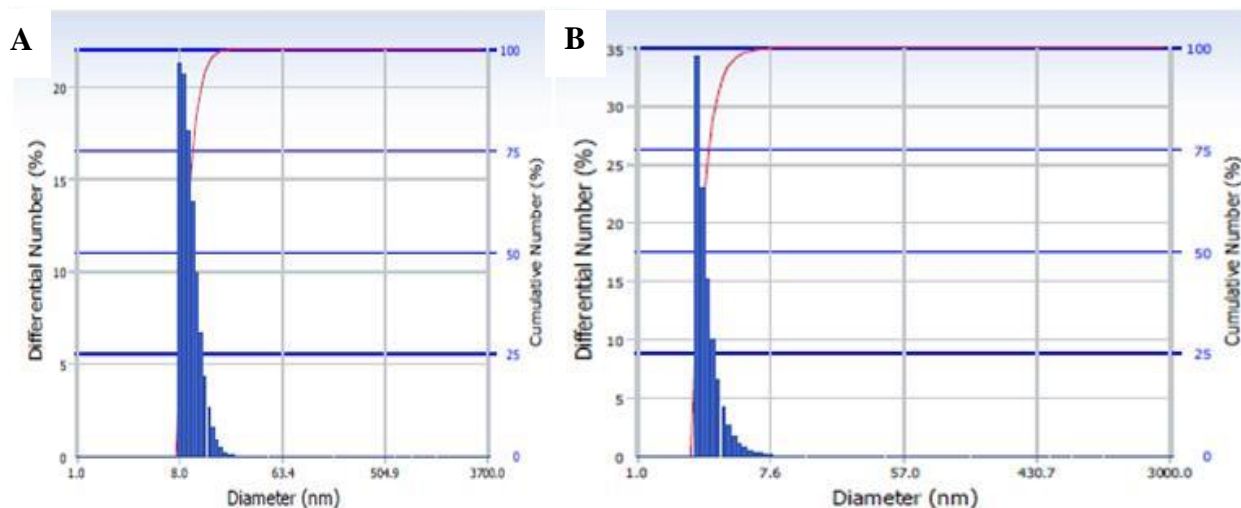


Figura 7. Distribuição de tamanhos das NpsAg por espectroscopia de correlação fotônica, (A) Citrato de sódio e (B) NaBH_4 .

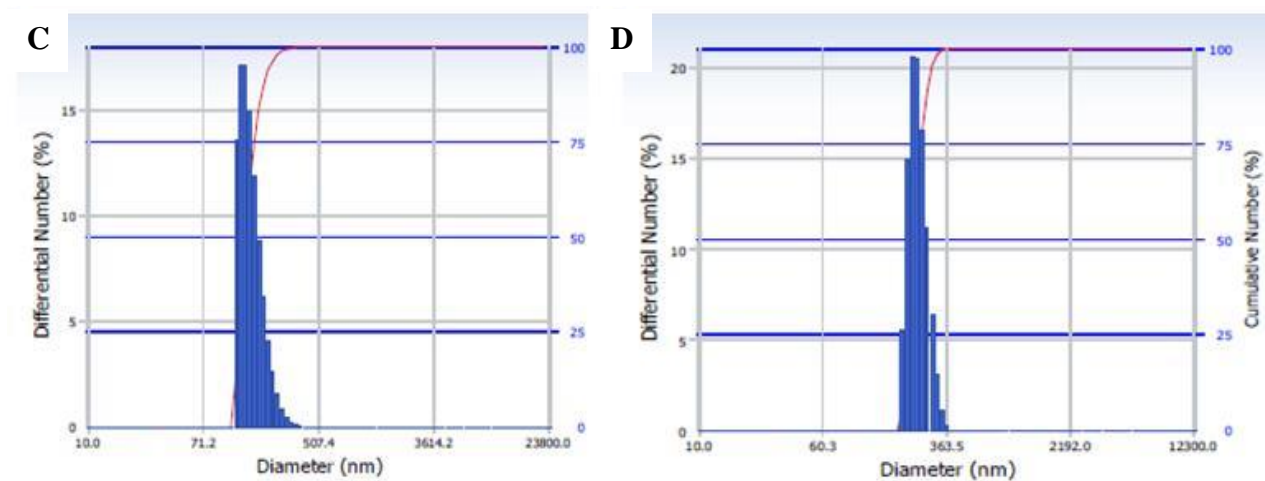


Figura 8. Distribuição de tamanhos das NpsAg por espectroscopia de correlação fotônica, (C) Ácido ascórbico com PVA e (D) Ácido ascórbico com PVP.

Tabela 2. Valores de tamanhos médios e distribuição de tamanhos com o índice de polidispersão (PI) das NpAg recorrendo a diferentes agentes redutores e agentes estabilizantes (média \pm desvio padrão, n=3).

Síntese	Agente redutor	Agente estabilizante	Tamanho médio \pm D.P.	Distribuição de tamanho (PI)
A	Citrato de sódio	-	9,9 \pm 2,0	0,131
B	NaBH ₄	-	2,9 \pm 0,6	0,116
C	Ácido ascórbico	PVA	160,5 \pm 34,6	0,417
D	Ácido ascórbico	PVP	240,0 \pm 32,4	0,277

Associação das NpsAg com Ampicilina

Considerando os resultados anteriores, as nanopartículas reduzidas com ácido ascórbico e os diferentes agentes estabilizadores formaram partículas muito acima dos 100 nm por isso, nesta fase do projeto associou-se às NpsAg reduzidas com citrato de sódio e NaBH₄ a ampicilina a $2,12 \times 10^{-4}$ M (Brown et al. 2012). Nesta fase do projeto recorreu-se à ampicilina por ser um antibiótico muito usado nas infeções do trato respiratório superior e de ser sensível a Gram-positivas e Gram-negativas.

Eficiência de associação das NpsAg com ampicilina

Dez mililitros de NpsAg foram incubados com 10mL de ampicilina a $2,12 \times 10^{-4}$ M durante 24 horas com uma velocidade de agitação 250 rpm ao abrigo da luz.

A percentagem de ampicilina associada às nanopartículas foi determinada de forma indireta, isto é, foi calculada a quantidade de ampicilina no sobrenadante após uma centrifugação ($27000 \times g$, 20 minutos, Hermle Labortechnik, Wehingen, Alemanha) a 19°C e que não reagiu com a prata. As medições foram feitas em triplicado através de um método espectrofotométrico a 256 nm (UV-visible spectrophotometer, Evolution 300, Hertfordshire, Reino Unido). Efetuou-se uma curva de calibração com uma gama de linearidade que foi estabelecida no intervalo 50-1000 μ g/mL ($R^2 = 0,9991$), (Figura 9).

Os valores de EA foram calculados respeitando a seguinte equação

$$EA \% = \frac{(\text{ampicilina inicial adicionada} - \text{ampicilina no sobrenadante})}{\text{ampicilina inicial adicionada}} \times 100$$

Tabela 3. Valores de absorvância de ampicilina na gama de concentrações 50-1000µg/mL a 256nm.

Concentração de ampicilina (µg/mL)	Abs
50	0,006
100	0,085
300	0,266
500	0,455
700	0,641
1000	0,923
Ampicilina	0,055
Citrato de sódio	0,03
NaBH ₄	0,025

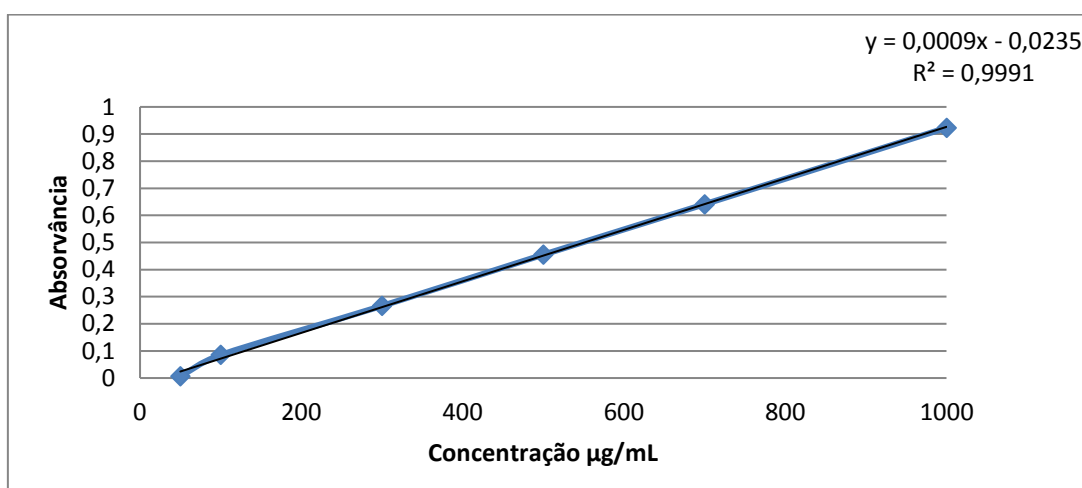


Figura 9. Curva de calibração da Ampicilina a 256nm.

Os resultados encontram-se descritos na Tabela 4. Verificou-se que a eficiência de associação foi entre 30 a 40%. A associação de ampicilina na superfície das NpAg conduziu a um aumento do tamanho médio, confirmando assim a presença do antibiótico neste sistema de veiculação.

Tabela 4. Eficiência de associação da ampicilina nas NpsAg.

AgNp	[Ampicilina] µg/mL sobrenadante	% Ampicilina no sobrenadante	% Eficiência de associação	Tamanho médio ± D.P.
Citrato	59,44	68,153	31,847	63,4±3,8
NaBH₄	53,89	61,783	38,217	32,2±2,1

Morfologia das NpsAg com Ampicilina

A forma das NpsAg com a ampicilina foi estudada pela microscopia de força atômica (AFM). As NpsAg apresentaram forma irregular, por vezes esférica mas por vezes a presença de aglomerados que no seu conjunto apresentavam forma irregular. Nesta fase verificou-se que a associação das NpsAg com a ampicilina conduziu a um aumento do tamanho médio tal como demonstra as Figuras 10 e 11.

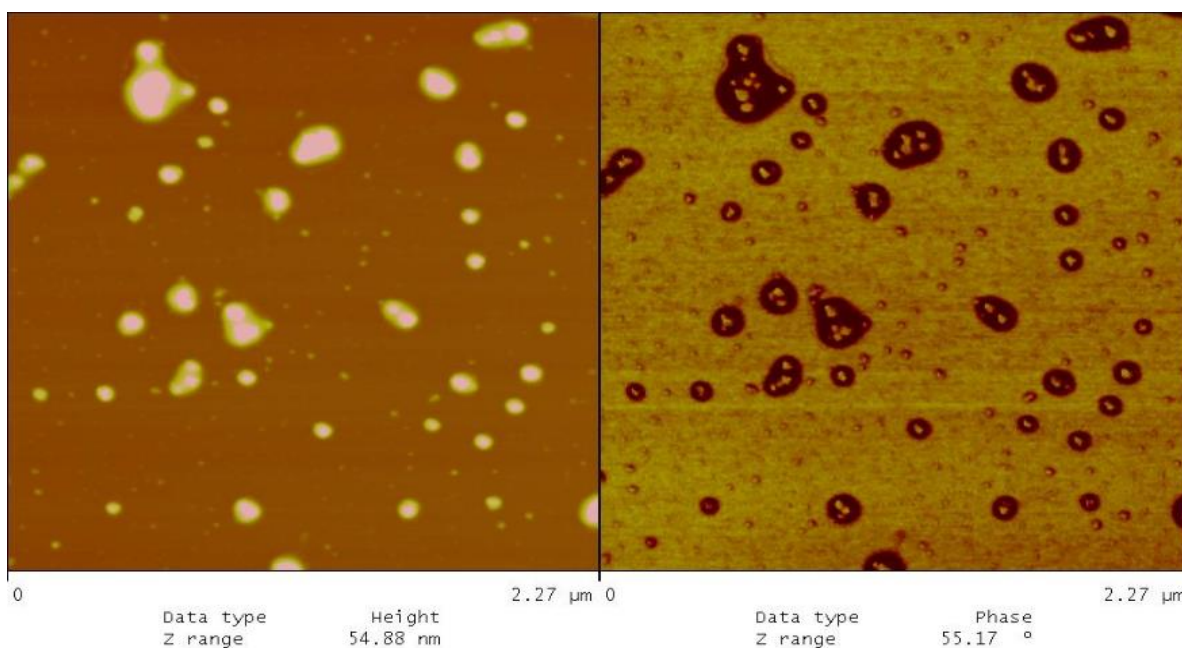


Figura 10. Imagem obtida por AFM das NpsAg com citrato de sódio e ampicilina.

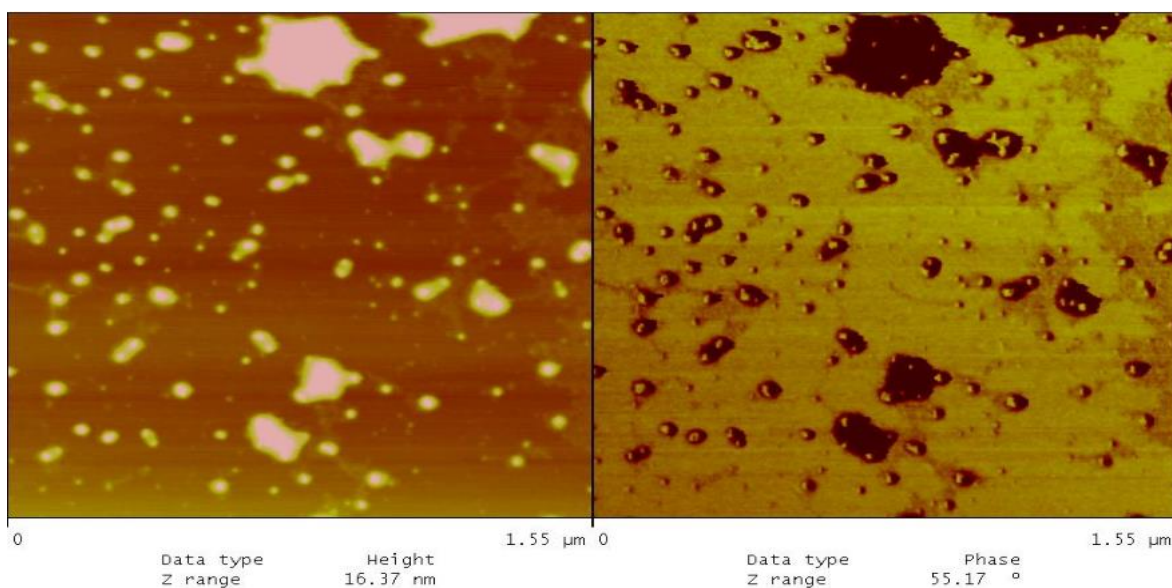


Figura 11. Imagem obtida por AFM das NpsAg com NaBH₄ e ampicilina.

Testes de eficácia *in vitro* das NpsAg

Foi testada a eficácia da atividade antibacteriana das NpsAg com citrato de sódio, NaBH₄ e ampicilina recorrendo a placas de petri com meio *Sabouraud* para as leveduras *C. albicans*, *S. cerevisiae* e com meio *Mueller-Hinton* para bactérias *S. aureus*, *S.epidermidis*, *K.pleumoniae* e MRSA. Testaram-se as NpsAg sintetizadas com NaBH₄, NpsAg sintetizadas com citrato de sódio, NpsAg sintetizadas com NaBH₄ e ampicilina, NpsAg sintetizadas com citrato de sódio e ampicilina, Ampicilina. (Tabela 5).

Materiais

Os microrganismos usados foram *Staphylococcus aureus* ATCC 2592, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 9997, MRSA CIP 106760, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Os restantes reagentes foram de grau analítico.

Metodologia da eficácia *in vitro* das NpsAg e ampicilina

Foi estudada a eficácia da atividade antibacteriana das NpsAg com citrato de sódio, NaBH₄ e ampicilina em placas de petri com meio *Sabouraud* para as leveduras *C. albicans*, *S. cerevisiae* e meio *Mueller-Hinton* para bactérias *S. aureus*, *S.epidermidis*, *K.pleumoniae* e MRSA. Inicialmente, os microrganismos foram inoculados nos respetivos meios. Estas suspensões bacterianas foram espalhadas sobre a superfície da placa de petri recorrendo-se a uma zaragatoa estéril. Posteriormente, os poços foram feitos no agar com aproximadamente 5mm de diâmetro e com uma pipeta de Pasteur. Em seguida, 50µL de cada amostra adicionados aos poços: NpsAg sintetizadas com NaBH₄, NpsAg sintetizadas com citrato de sódio, NpsAg sintetizadas com NaBH₄ e ampicilina, NpsAg sintetizadas com citrato de sódio e ampicilina, ampicilina e dos controlos positivos para as leveduras, a nistatina. Para as bactérias Gram-positivas (*S.aureus*, *S.epidermidis*) para as bactérias Gram-negativas (*K.pleumoniae*) e MRSA recorreu-se à vancomicina e ampicilina. (Figura 12). As placas inoculadas foram incubadas durante 24h a 37°C numa estufa de ar quente. Após esse período, os diâmetros das zonas de inibição foram medidos em milímetros. Todos os ensaios foram realizados sob condições de assepsia e em triplicado.

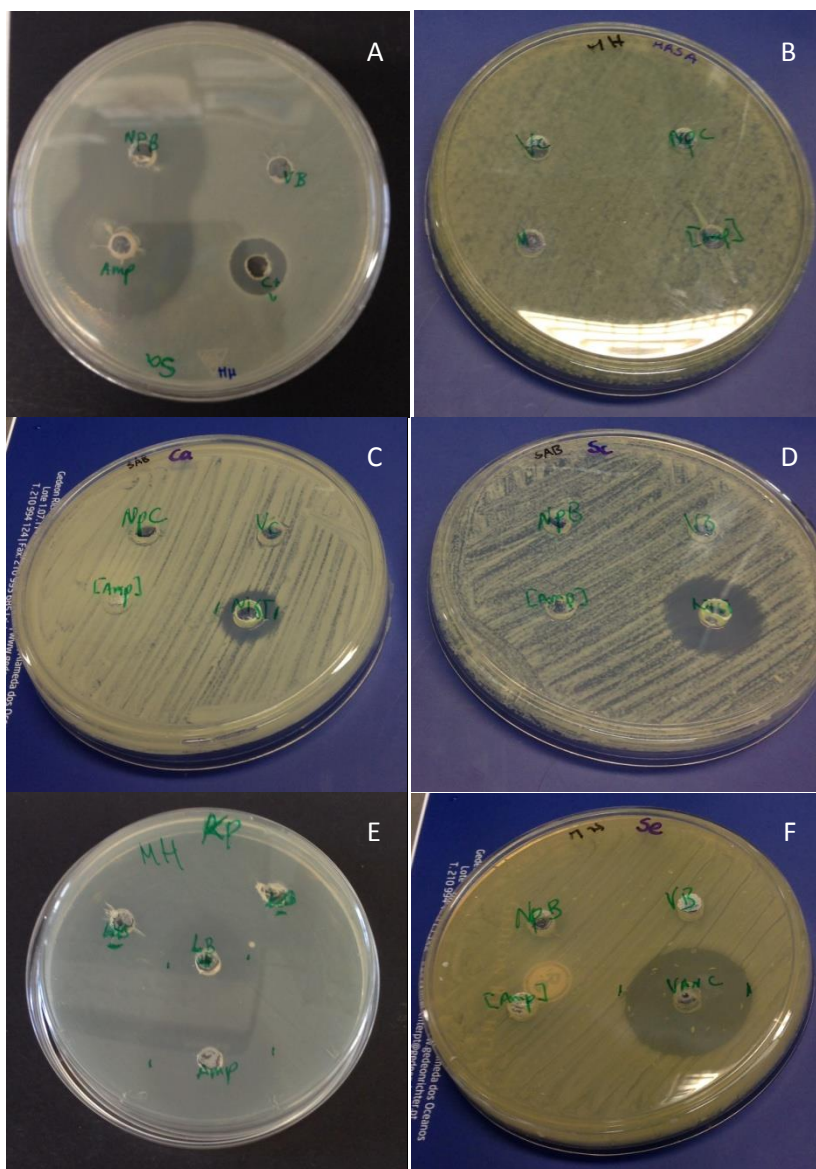


Figura 11. Resultados de eficácia *in vitro* das bactérias e leveduras com os respetivos halos de inibição: (A) NpsAg por redução com NaBH_4 no *S. aureus* e (B) NpsAg por redução com citrato de sódio em MRSA e (C) NpsAg por redução com citrato de sódio na *C. albicans* e (D) NpsAg por redução com NaBH_4 na *S. cerevisiae* e (E) NpsAg por redução com NaBH_4 na *K. pneumoniae* e (F) NpsAg por redução com NaBH_4 no *S. epidermidis*.

Tabela 5. Halos de inibição em milímetros.

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	MRSA	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>
NpsAg com NaBH_4	5	5	5	5	5	5
NpsAg NaBH_4 e ampicilina	35	5	5	32	5	5
NpsAg com citrato de sódio	5	5	5	5	5	5
NpsAg com citrato de sódio e ampicilina	34	5	5	32	5	5
Ampicilina	34	5	5	31	5	5
Controlo positivo*	15	20	17		15	12

*Controlo positivo: Vancomicina (*S. aureus*, *S. epidermidis* e MRSA), ampicilina (*K. pneumoniae*) e nistatina (*S. cerevisiae*, *C. albicans*).

Discussão da parte experimental

O trabalho experimental decorreu durante um período de um ano. Tal como referido anteriormente foram testados diferentes métodos de síntese das NpsAg. Da pesquisa baseada em estudos anteriores descritos na literatura foram selecionados os seguintes agentes redutores: ácido ascórbico, NaBH_4 e citrato de sódio. Além destes foi avaliada a presença de agentes estabilizantes tais como PVP e PVA.

Dos resultados descritos na secção anterior, verificou-se que as NpsAg apresentaram um tamanho concordante com estudos anteriores (Allahverdiyev et al. 2011; Ma et al. 2011). Os melhores agentes redutores foram: o NaBH_4 e o citrato de sódio, tal como evidenciado em estudos anteriores (Kora & Rastogi 2013).

A dimensão das NpsAg é um fator crucial para a sua absorção. De acordo com estudos anteriores o tamanho das nanopartículas deverão ser inferiores a 40 nm para que ocorra uma permeação cutânea (Gajbhiye & Sakharwade 2016). Além disso, é igualmente desejável que as NpsAg sejam uniformes entre si, isto porque, diferentes tamanhos naturalmente conduzirão a absorções diferentes (Tak et al. 2015). As nanopartículas obtidas a partir do citrato de sódio e do NaBH_4 como agentes redutores apresentaram dimensões menores do que 20 nm e foram sempre monodispersas. Os agentes redutores como o citrato de sódio conduziram a um processo de redução mais lento. Observou-se que o tempo de reação com citrato de sódio para a formação das nanopartículas é de difícil monitorização, isto é, se ficar demasiado tempo à ebulição mais de 2 minutos observa-se uma rápida mudança da coloração amarelo para acinzentado que é a cor que caracteriza aglomerados de partículas. Por outro lado, se for retirado logo no início da ebulição pode não ocorrer a redução completa dos iões de prata.

Este estudo demonstrou ainda que foi possível associar um antibiótico as nanopartículas. O aumento do tamanho das NpsAg sugere a presença do fármaco e o mesmo sugere a morfologia. No entanto, o valor da eficiência de associação obtido foi francamente baixo quando comparado com outros sistemas de veiculação.

Por último, os estudos de eficácia *in vitro* não demonstraram uma atividade antibacteriana para NpsAg sintetizadas com NaBH_4 ou citrato de sódio. Porém, surge uma hipótese que deve ser considerada: a concentração de prata poderá ser baixa para a quantidade de fármaco que terá de ser adsorvida. Este facto foi ainda observado em

estudos anteriores (Williams et al. 2016) e, no nosso caso, poderá ainda refletir-se nos resultados dos estudos preliminares com culturas bacterianas, onde foi verificado total ausência de efeito antibacteriano das próprias NpsAg.

6. Considerações toxicológicas

Os estudos toxicológicos descritos na literatura têm relatado resultados controversos. Existem estudos em que as NpsAg não causam efeitos citotóxicos nem genotóxicos em células da medula óssea, eritrócitos ou queratinócitos humanos (Yu & Ray 2013). Em outros estudos, as NpsAg podem induzir stress oxidativo em células hepáticas humanas, danificar o ADN em células testiculares, fibroblastos, células sanguíneas e células renais humanas. Estas discrepâncias podem ser explicadas por enormes diferenças das propriedades das NpsAg (Samberg et al. 2010) ou na falta de caracterização das NpsAg, especialmente nas condições reais de exposição. Além disso, grande parte destas discrepâncias são provavelmente devidas ao facto de que a forma iónica da prata (mais tóxica) estar frequentemente presente nas soluções em simultâneo com as NpsAg (menos tóxica) devido ao seu elevado potencial de dissolução (Prabhu & Poulouse 2012).

Um estudo que merece particular atenção foi publicado em 2013 onde se analisou a influência do tamanho e do revestimento das NpsAg em células pulmonares humanas. Os resultados revelaram que apenas a citotoxicidade das partículas de 10 nm foi independente do revestimento. Em contraste, todas as NpsAg danificaram o ADN após 24 horas. Contudo, não houve aumento da produção de ROS intracelular. Portanto, a toxicidade observada relacionou-se com a taxa de libertação de Ag^+ intracelular, ou seja, as NpsAg com maior libertação de Ag^+ são mais tóxicas (Fard et al. 2015). No entanto, persiste ainda uma falta de informação da exposição humana, animal e ecológica das NpsAg incluindo os potenciais riscos relacionados com a toxicidade a longo prazo (Tran et al. 2013).

7. Conclusões/ Perspetivas futuras

A Nanotecnologia representa uma abordagem moderna e inovadora para desenvolver novas formulações. Esta dissertação abordou de forma abrangente a síntese de NpsAg, as suas aplicações terapêuticas e toxicidade. Em termos experimentais, as NpsAg foram sintetizadas com sucesso recorrendo aos diferentes agentes redutores e estabilizadores. A encapsulação com a ampicilina foi relativamente bem sucedida sendo que o agente redutor escolhido para continuação do trabalho deverá ser o NaBH_4 , porque sintetizou NpsAg menores do que 20 nm de diâmetro e o processo de síntese é rápido e forma nanopartículas minodispersas.

Estudos futuros terão que ser feitos para otimizar a concentração de prata e analisar a atividade antibacteriana das NpsAg resultantes. Numa fase seguinte incluiremos as NpsAg num hidrogel termorreversível para aplicação tópica e procederemos a uma avaliação físico-química detalhada.

8. Referências bibliográficas

- Abdulaziz, A., Al, A. & Ghazwani, A.A., 2015. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* and *Alternaria solani*. , 14(26), pp.2170–2174.
- Abou El-Nour, K.M.M. et al., 2010. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(3), pp.135–140.
- Adhikari, K.K. et al., 2015. Silver-Nanoparticle-Based Screen-Printing and Film Characterization of a Disposable, Dual-Band, Bandstop Filter on a Flexible Polyethylene Terephthalate Substrate. *Journal of Nanomaterials*, 2015.
- Ahmad, N. et al., 2015. Phytofabrication of bioinduced silver nanoparticles for biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*, 10, pp.7019–7030.
- Ahmed, S. et al., 2016. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*, 7(1), pp.17–28.
Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2015.02.007>.
- Allahverdiyev, A.M. et al., 2011. Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. Expert review of anti-infective therapy, 9(11), pp.1035–52.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22029522>.
- Arvizo, R. et al., 2012. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. *Chemical Society Reviews*, 41(7), pp.2–25. Available at: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2012/cs/c2cs15355f>.
- Arcangeli, C. et al., 2012. Approaching the responsible use of nanotechnologies. The global trends. *EAI: Energia, Ambiente e Innovazione*, pp.66–77.
- Ashour, A.A. et al., 2015. Green synthesis of silver nanoparticles using cranberry powder aqueous extract: Characterization and antimicrobial properties. *International Journal of Nanomedicine*, 10, pp.7207–7221. Available at: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L607202611> \n<http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S87268> \n<http://bb2sz3ek3z.search.serialssolutions.com?sid=EMBASE&issn=11782013&id=doi:10.2147/IJN.S87268&title=Green+synthesis+of+silver+na>.
- Blandón, L. et al., 2012. Electrochemical Synthesis of Silver Nanoparticles and their

- Potential Use as Antimicrobial Agent: a Case Study on Escherichia Coli. *Port. Electrochim. Acta*, 30(2), pp.135–144.
- Brown, A.N. et al., 2012. Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied and environmental microbiology*, 78(8), pp.2768–74. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3318834&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 22, 2015]
- Chandran, S.P. et al., 2006. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. *Biotechnol Prog*, 22(2), pp.577–583. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16599579.
- Chaudhari, A.A. et al., 2016. Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12).
- Chen, J. et al., 2008. Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles by carboxymethyl cellulose sodium and silver nitrate. *Materials Chemistry and Physics*, 108(2–3), pp.421–424.
- Chung, I.-M. et al., 2016. Plant-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles: Their Characteristic Properties and Therapeutic Applications. *Nanoscale research letters*, 11(1), p.40. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84957024700&partnerID=tZOtx3y1>.
- Darroudi, M. et al., 2011. Fabrication and characterization of gelatin stabilized silver nanoparticles under UV-Light. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), pp.6346–6356.
- Das, V.L. et al., 2013. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by the *Bacillus* strain CS 11 isolated from industrialized area. *3 Biotech*, 4(2), pp.121–126. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-013-0130-8>.
- Deepak, V. & Kalishwaralal, K., 2011. Metal Nanoparticles in Microbiology. *Metal Nanoparticles in Microbiology*, pp.17–36. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-18312-6>.
- Dennis, V. et al., 2013. Anti-inflammatory effects of silver-polyvinyl pyrrolidone (Ag-PVP) nanoparticles in mouse macrophages infected with live *Chlamydia trachomatis*. *International Journal of Nanomedicine*, p.2421. Available at:

- <http://www.dovepress.com/anti-inflammatory-effects-of-silver-polyvinyl-pyrrolidone-ag-pvp-nanop-peer-reviewed-article-IJN> [Accessed October 9, 2016].
- Dinesh, S. et al., 2012. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Glycyrrhiza glabra* root extract. *Archives of Applied Science Research*, 4(1), pp.178–187.
- Drbohlavova, J. et al., 2013. Nanocarriers for anticancer drugs - New trends in nanomedicine. *Current Drug Metabolism*, 14(5), pp.547–564. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84881631402&partnerID=40&md5=c213f794505a3ef4089a0917e674ccf1>.
- Elechiguerra, J.L. et al., 2005. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, 3, p.6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1190212&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- El-kheshen, A.A. & El-rab, S.F.G., 2012. Effect of reducing and protecting agents on size of silver nanoparticles and their anti-bacterial activity. , 4(1), pp.53–65.
- Encarnacion-rosado, J. et al., 2016. Improving cytotoxicity against cancer cells by chemo-photodynamic combined modalities using silver-graphene quantum dots nanocomposites. , pp.107–119.
- Fard, J.K., Jafari, S. & Eghbal, M.A., 2015. A review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(4), pp.447–454. Available at: <http://dx.doi.org/10.15171/apb.2015.061>.
- Firdhouse, M.J. & Lalitha, P., 2015. Biosynthesis of silver nanoparticles and its applications. *Journal of Nanotechnology*, 2015. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s40643-015-0076-2>.
- Fong, J. & Wood, F., 2006. Nanocrystalline silver dressings in wound management: A review. *International Journal of Nanomedicine*, 1(4), pp.441–449.
- Franci, G. et al., 2015. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*, 20(5), pp.8856–8874.
- Gaikwad, S. et al., 2013. Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. *International Journal of Nanomedicine*, 8, pp.4303–4314.
- Gajbhiye, S. & Sakharwade, S., 2016. Silver Nanoparticles in Cosmetics. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 6(1), pp.48–53. Available at: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/jcdsa.2016.61007>.

- Galdiero, S. et al., 2011. Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Molecules*, 16(10), pp.8894–8918.
- Goudarzi, M. et al., 2016. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles prepared from two novel natural precursors by facile thermal decomposition methods. *Scientific reports*, 6(August), p.32539. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27581681> \n<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5007519>.
- Gurunathan, S. et al., 2015. Multidimensional effects of biologically synthesized silver nanoparticles in *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and human lung (L132) and lung carcinoma A549 cells. *Nanoscale research letters*, 10(1), p.35. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84923652247&partnerID=tZOtx3y1>.
- Guzmán, M.G.M., Dille, J. & Godet, S., 2008. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. *International Sholarly and Scientific Reserarch & Innovation*, 2(7), pp.91–98. Available at: <http://www.waset.ac.nz/journals/ijcbe/v2/v2-3-21.pdf>.
- Haes, A.J. & Van Duyne, R.P., 2002. A nanoscale optical biosensor: sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(35), pp.10596–10604. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12197762>.
- Haider, A. & Kang, I., 2015. Preparation of Silver Nanoparticles and Their Industrial and Biomedical Applications: A Comprehensive Review. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2015, p.16.
- Ip, M. et al., 2006. Antimicrobial activities of silver dressings: An in vitro comparison. *Journal of Medical Microbiology*, 55(1), pp.59–63.
- Iravani, S. et al., 2014. Synthesis of silver nanoparticles : chemical, physical and biological methods. , 9(6), pp.385–406.
- Jain, P. & Pradeep, T., 2005. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(1), pp.59–63.
- Jena, M. et al., 2013. Nanotechnology- future prospect in recent medicine: a review. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 2(4), p.353. Available at: <http://www.scopemed.org/?mno=37678>.
- Jha, A.K. & Prasad, K., 2010. Green synthesis of silver nanoparticles using *Cycas* leaf.

- Int J Green Nanotech Phy Chem*, 1(July 2016). Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/19430871003684572>.
- Jung, J.H. et al., 2006. Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area. *Journal of Aerosol Science*, 37(12), pp.1662–1670.
- Khaydarov, R.A. et al., 2009. Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(5), pp.1193–1200.
- Kheybari, S. et al., 2010. Synthesis and antimicrobial effects of silver nanoparticles produced by chemical reduction method. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 18(3), pp.168–72. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3304363&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kora, A.J. & Rastogi, L., 2013. Enhancement of antibacterial activity of capped silver nanoparticles in combination with antibiotics, on model gram-negative and gram-positive bacteria. *Bioinorganic chemistry and applications*, 2013, p.871097. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3732601&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kulkarni, N. & Muddapur, U., 2014. Biosynthesis of Metal Nanoparticles. *Journal of Nanotechnology*, 2014, pp.27–100.
- Lajcak, M. et al., 2013. Infection rates of external ventricular drains are reduced by the use of silver-impregnated catheters. *Acta Neurochirurgica*, 155(5), pp.875–881.
- Li, M. et al., 2013. Nano / Microstructured Materials : Rapid , Low-Cost , and Eco-Friendly. *Journal of Nanoparticles*.
- Ma, A. et al., 2011. Evaluation of antibacterial activity of silver nanoparticles against MSSA and MRSA on isolates from skin infections. *Research Article Biology and Medicine*, 3(2), pp.141–146.
- Mallikarjuna, K. et al., 2011. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Ocimum Leaf Extract and Their Characterization. , 6(1), pp.181–186.
- Manikprabhu, D. & Li, W., 2014. of silver nanoparticles. , pp.389–402.
- Marchiol, L. et al., 2014. In vivo synthesis of nanomaterials in plants: location of silver nanoparticles and plant metabolism. *Nanoscale research letters*, 9(1), p.101. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3973990&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Matsumura, Y. et al., 2003. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), pp.4278–4281.
- Mody, V. V et al., 2010. Introduction to metallic nanoparticles. *Journal of pharmacy and bioallied sciences*, 2(4), pp.282–289.
- Mohapatra, B. et al., 2015. Biosynthesis of high concentration, stable aqueous dispersions of silver nanoparticles using Citrus limon extract. *ADVANCED MATERIALS Letters*, 6(3), pp.228–234.
- Mulfinger, L. et al., 2007. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *Journal of Chemical Education*, 84(2), p.322. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed084p322>.
- Natsuki, J., Natsuki, T. & Hashimoto, Y., 2015. A Review of Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Properties and Applications. *International Journal of Materials Science and Applications*, 4(5), p.325. Available at: <http://www.sciencepublishinggroup.com/journal/paperinfo?journalid=123&doi=10.11648/j.ijmsa.20150405.17>.
- Pal, S., Tak, Y.K. & Song, J.M., 2015. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 290(42), pp.1712–1720.
- Polshettiwar, V., Nadagouda, M.N. & Varma, R.S., 2009. Microwave-assisted chemistry: A rapid and sustainable route to synthesis of organics and nanomaterials. *Australian Journal of Chemistry*, 62(1), pp.16–26.
- Prabhu, S. & Poulouse, E.K., 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2(1), p.32.
- Prucek, R., Kvitek, L. & Hrbac, J., 2004. Silver Colloids - Methods of Preparation and Utilization. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultas Rerum Naturalium*, CHEMICA 43, pp.3–12.
- Rai, M. & Yadav, A., 2013. Plants as potential synthesiser of precious metal nanoparticles: progress and prospects. *IET nanobiotechnology / IET*, 7(3), pp.117–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24028810>.
- Rajan, K. et al., 2016. Silver nanoparticle ink technology: State of the art.

- Nanotechnology, Science and Applications*, 9, pp.1–13.
- Rigo, C. et al., 2013. Active Silver Nanoparticles for Wound Healing. , pp.4817–4840.
- Roldán, M.V., Pellegrini, N. & de Sanctis, O., 2013. Electrochemical Method for Ag-PEG Nanoparticles Synthesis. *Journal of Nanoparticles*, 2013, pp.1–7. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jnp/2013/524150/>.
- Rudramurthy, G.R. et al., 2016. Nanoparticles: Alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. *Molecules*, 21(7), pp.1–30.
- Sabri, M.A. et al., 2016. Selection of Suitable Biological Method for the Synthesis of Silver Nanoparticles. *Nanomaterials and Nanotechnology*, p.1. Available at: http://www.intechopen.com/journals/nanomaterials_and_nanotechnology/selection-of-suitable-biological-method-for-the-synthesis-of-silver-nanoparticles.
- Samberg, M.E., Oldenburg, S.J. & Monteiro-Riviere, N.A., 2010. Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin in vivo and keratinocytes in vitro. *Environmental Health Perspectives*, 118(3), pp.407–413.
- Sanford, J. & Venkatapathy, R., 2010. State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver. *U.s.environmental protection Agency*.
- Sant, D.G. et al., 2013. Adiantum philippense L. Frond Assisted Rapid Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles. *Journal of Nanoparticles*, 2013, pp.1–9. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/nanoparticles/2013/182320/>.
- Schmieder, R. & Edwards, R., 2012. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future microbiology*, 7, pp.73–89.
- Shahverdi, A.R. et al., 2007. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(2), pp.168–171.
- Shameli, K. et al., 2012. Green biosynthesis of silver nanoparticles using Curcuma longa tuber powder. *International Journal of Nanomedicine*, 7, pp.5603–5610.
- Silva Santos, K. et al., 2016. Silver Nanocomposite Biosynthesis: Antibacterial Activity against Multidrug-Resistant Strains of Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii. *Molecules*, 21(10), p.1255. Available at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/9/1255>.
- Skirtach, A.G. et al., 2006. Laser-induced release of encapsulated materials inside living cells. *Angewandte Chemie - International Edition*, 45(28), pp.4612–4617.
- Sondi, I. & Salopek-Sondi, B., 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case

- study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1), pp.177–182.
- Srikar, S.K. et al., 2016. Green Synthesis of Silver Nanoparticles: A Review. , (February), pp.34–56.
- Sriram, M.I. et al., 2010. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. *International Journal of Nanomedicine*, 5(1), pp.753–762.
- Sun, Y. & Xia, Y., 2002. Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles. *Science (Washington, DC, United States)*, 298(5601), pp.2176–2179.
- Swai, H.S., 2016. Antimicrobial dependence of silver nanoparticles on surface plasmon resonance bands against *Escherichia coli*. , pp.1–9.
- Swaminadham, V. et al., 2014. A Facile and Eco-friendly Approach to Synthesize Silver Nanoparticles from *Eclipta prostrata* and Their Anti- bacterial Studies on Isolated Human Pathogens. , 5(1), pp.83–90.
- Synthesis, G. et al., 2013. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using the Aqueous Extract of *Portulaca Oleracea* (L.). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(1), pp.2011–2013.
- Tak, Y.K. et al., 2015. Shape-Dependent Skin Penetration of Silver Nanoparticles: Does It Really Matter? *Scientific Reports*, 5, p.16908. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4653615&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>5Cn<http://www.nature.com/articles/srep16908>.
- Tian, J. et al., 2007. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem*, 2(1), pp.129–136.
- Tien, D.C. et al., 2008. Novel technique for preparing a nano-silver water suspension by the arc-discharge method. *Reviews on Advanced Materials Science*, 18(8), pp.752–758.
- Tran, Q.H., Nguyen, V.Q. & Le, A.-T., 2013. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4(3), p.33001. Available at: <http://stacks.iop.org/2043-6262/4/i=3/a=033001?key=crossref.d8981ba42bf922920ec3657457f86140>.
- Trefry, J.C., 2011. *The development of silver nanoparticles as antiviral agents*,
- Tsuji, T. et al., 2002. Preparation of silver nanoparticles by laser ablation in solution: Influence of laser wavelength on particle size. *Applied Surface Science*, 202(1–2),

pp.80–85.

- Uchihara, T., 2007. Silver diagnosis in neuropathology: Principles, practice and revised interpretation. *Acta Neuropathologica*, 113(5), pp.483–499.
- Vahabi, K., Mansoori, G.A. & Karimi, S., 2011. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Fungus *Trichoderma Reesei* (A Route for Large-Scale Production of AgNPs). *Insciences Journal*, 1(1), pp.65–79.
- Velusamy, P. et al., 2016. Bio-inspired green nanoparticles: Synthesis, mechanism, and antibacterial application. *Toxicological Research*, 32(2), pp.95–102.
- Vigneshwaran, N. et al., 2007. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Materials Letters*, 61(6), pp.1413–1418.
- Wang, B. et al., 2010. Microwave-Assisted Synthesis of Silver Nanoparticles in Alkaline Carboxymethyl Chitosan Solution. *Engineering*, 2(5), pp.387–390. Available at: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/eng.2010.25050>.
- Wiley, B. et al., 2005. Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: The case of silver. *Chemistry - A European Journal*, 11(2), pp.454–463.
- Williams, K.M. et al., 2016. Size and dose dependent effects of silver nanoparticle exposure on intestinal permeability in an in vitro model of the human gut epithelium. *Journal of nanobiotechnology*, 14(1), p.62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27465730> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4963959>.
- Wong, I.Y., Bhatia, S.N. & Toner, M., 2013. Nanotechnology: Emerging tools for biology and medicine. *Genes and Development*, 27(22), pp.2397–2408.
- Xiang, D. et al., 2013. Inhibition of A/Human/Hubei/3/2005 (H3N2) influenza virus infection by silver nanoparticles in vitro and in vivo. *International Journal of Nanomedicine*, 8, pp.4103–4114.
- Xing, M. et al., 2014. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *International Journal of Nanomedicine*, p.2399. Available at: <http://www.dovepress.com/nanosilver-particles-in-medical-applications-synthesis-performance-and-peer-reviewed-article-IJN> [Accessed October 8, 2016].
- Yamada, M., Foote, M. & Prow, T.W., 2015. Therapeutic gold, silver, and platinum nanoparticles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 7(3), pp.428–445.
- Yu, H. & Ray, P.C., 2013. NIH Public Access. , 487, pp.1–11.

- Zhang, X.-F. et al., 2016. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), p.1534. Available at: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/9/1534>.
- Zheng, J., 2011. Sterilization of Silver Nanoparticles Using Standard Gamma Irradiation Procedure Affects Particle Integrity and Biocompatibility. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, S5 (1), p.1. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4098784&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Zhou, W. et al., 2011. A label-free biosensor based on silver nanoparticles array for clinical detection of serum p53 in head and neck squamous cell carcinoma. *International journal of nanomedicine*, 6, pp.381–386.